

Universität Rostock



Traditio et Innovatio

Aus dem Institut für Anatomie
der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock

INAUGURALDISSERTATION

Auswirkungen von Miglustat bzw. einer Kombination aus
Cyclodextrin, Allopregnanolon und Miglustat auf Verhalten,
Motorik, Schmerzempfinden und Gewichtsentwicklung von
BALB/c-Wildtypmäusen

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Rostock – Universität Rostock

von

Markus Thieme aus Naumburg/Saale,
geboren am 31.07.1989 in Naumburg/Saale

„Was wir wissen, ist ein Tropfen; was wir nicht wissen, ein Ozean.“
Sir Isaac Newton

Gutachter:

1. Prof. Dr. Andreas Wree
Institut für Anatomie, Universität Rostock
2. Prof. Dr. Arndt Rolfs
Albrecht-Kossel-Institut für Neuroregeneration, Universität
Rostock
3. Prof. Dr. Oliver von Bohlen und Halbach
Institut für Anatomie und Zellbiologie, Universität Greifswald

Datum der Einreichung: 06. Januar 2017

Datum der Promotion: 13. Februar 2018

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
1. Einleitung	8
1.1 Hintergrund dieser Arbeit	8
1.2 Morbus Niemann-Pick Typ C	9
1.3 Klinik	10
1.4 Pathogenese	11
1.5 Auswirkungen auf die Hirnstruktur	16
1.6 Therapie	16
1.6.1 Miglustat (Handelsname Zavesca®)	17
1.6.2 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin	19
1.6.3 Allopregnanolon	21
1.6.4 weitere Therapieansätze	22
1.7 Tiermodelle	23
1.8 Ziel der Arbeit und Fragestellungen	25
2. Methoden	26
2.1 Versuchstiere	26
2.2 Pharmakologische Behandlung der Tiere	27
Abb.10 Behandlungsplan für die Gruppe Miglu	28
2.3 Gewichtsbestimmung, Blutentnahme und Präparation der Tiere	28
2.4 Elevated Plus Maze	29
2.5 Open Field	31
2.7 Accelerod Test/ Rota Rod	35
3. Ergebnisse	39
3.1 Gewichtsentwicklung der Tiere	39
3.2 Elevated Plus Maze	41
3.2.1 Erkundungsverhalten/Emotionalität	41
3.2.2 Motorische Aktivität	43
3.3 Open Field	45
3.3.1 Erkundungsverhalten/Emotionalität	45
3.3.2 Motorische Aktivität	46
3.4 Ergebnisse Hot Plate	47
4. Diskussion	49

4.1 Pharmakologische Behandlung	49
4.2 Gewichtsentwicklung der Tiere.....	51
4.3 Elevated Plus Maze	54
4.4 Open Field	55
4.5 Hot Plate.....	55
5. Zusammenfassung.....	57
6. Literaturverzeichnis.....	58
7. Erklärung.....	66
8. Danksagungen.....	67

Abkürzungsverzeichnis

5a-DHP	5 α -Dihydroprogesteron
ATP	Adenosintriphosphat
BRT	by-product replacement therapy
Bzw.	Beziehungsweise
©	copyright
°C	Grad Celsius
ca.	circa
c-Abl	Abelson murine leukemia viral oncogene
CAS Nr.	Chemical Abstracts Service Number
CHO	Chinese Hamster Ovary
cm	Centimeter
Cu	Kupfer (Cuprum)
EPM	Elevated Plus Maze
ERKs	Extracellular-signal Regulated Kinases
EU	Europäische Union
g	Gramm
GABA _A -Rezeptor	<i>gamma</i> -Aminobuttersäure A Rezeptor
GCS	Glucosylceramidsynthase
GM2/GM3	Monosialotetrahexosylganglioside 2 und 3
H	Wasserstoff (Hydrogenium)

Abkürzungsverzeichnis

HMGCoA-Reduktase	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase
HOPS-Komplex	homotypic fusion and vacuole protein sorting complex
HPBCD	2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin
HP γ -Cyclodextrin	2-Hydroxypropyl- γ -cyclodextrin
IQR	Interquartile Range = Interquartilenabstand
kD	Kilodalton
kg	Kilogramm
L/B/H	Länge/Breite/Höhe
LDL	Low-density Lipoprotein
Lux	Beleuchtungstärke
mg	Milligramm
mGSH	Mitochondriales Glutathion
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mRNA	messenger ribonucleic acid
MW	Mittelwert
MRF	Myelin Gene Regulatory Factor
N	Stickstoff (Nitrogenium)
NaCl	Natriumchlorid

Abkürzungsverzeichnis

NFT	neurofibrillary tangles
NPC	Morbus Niemann-Pick Typ C
NPC1/NPC 2 (Protein)	Niemann-Pick disease, type C1/type C2 (Protein)
O	Sauerstoff (Oxygenium)
OF	Open Field Test
ORP5	oxysterol-binding protein-related protein 5
ORP1L	oxysterol-binding protein-related protein 1L
PFA	Paraformaldehyd
Px (P1, etc.)	Postnataler Tag
®	Registered trademark
ROS	Reactive oxygen species
s	Sekunden
SMDP1-Gen	sphingomyelin phosphodiesterase 1, acid lysosomal
SRT/BRT	Substrat-Reduction-Therapy/ By-Product-Replacement-Therapy
Stabw	Standardabweichung
u.a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
VAP-A	Vesicle-associated membrane protein-associated protein A
Vitamin E	<i>alpha</i> -Tocopherol (aktive Form)

1. Einleitung

1.1 Hintergrund dieser Arbeit

Genetische Defekte, die bestimmte Zellstoffwechselvorgänge verändern und damit bestimmte Erkrankungen hervorrufen, zeigen uns nach wie vor die Komplexität zellulärer Vorgänge, sowie die Grenzen der modernen Medizin. Den Betroffenen kann von ärztlicher Seite meist nur eine lindernde bzw. das Fortschreiten der Erkrankung verlangsamende Therapie angeboten werden. Morbus Niemann-Pick ist eine solche Erkrankung. Es handelt sich um eine autosomal rezessiv vererbte, lysosomale Speicherkrankheit, die durch Mutationen im *NPC1*- bzw. *NPC2*-Gen verursacht wird (Carstea et al. 1997, Vance 2006). Der Funktionsverlust des NPC1- oder NPC2-Proteins führt zu Störungen des intrazellulären Transports von Cholesterin und anderen Lipiden in späten Endosomen bzw. Lysosomen (Neufeld et al. 1999, Vance 2006). Zur Erforschung dieser bisher unheilbaren Krankheit wird seit Jahren das BALB/c-npc1nih *NPC1*^{-/-}-Mausmodell genutzt. Die bei den Tieren durch einen Gendefekt entstehende Erkrankung ahmt die menschliche Variante in Teilen nach. So kommt es ebenfalls zu Lipidspeicherstörungen mit einhergehender neuronaler Degeneration, zum Beispiel mit massivem Verlust an Purkinjezellen (Morris et al. 1982, Sarna et al. 2003). Die therapeutischen Möglichkeiten sind dennoch begrenzt. Bisher sind positive Effekte auf den Krankheitsbeginn und -verlauf vor allem für Miglustat, Allopregnanolon und β -Cyclodextrin im *NPC1*^{-/-}-Tiermodell beschrieben. Miglustat ist ein Inhibitor der Glucosylceramidsynthase und verlangsamt den Krankheitsprogress (Zervas et al. 2001). Zugelassen von der Europäischen Arzneimittel-Agentur (EMA) zur Behandlung des Morbus Gaucher und NPC vermag es die klinischen Symptome zu verringern und wird in der Langzeitanwendung gut vertragen (Patterson et al. 2007, Pineda et al. 2009, Wraith et al. 2010). Ähnlich positive Eigenschaften in Bezug auf die Lebensspanne, Krankheitsbeginn und Lipidakkumulation besitzen Allopregnanolon gelöst in β -Cyclodextrin (Griffin et al. 2004). Kombiniert mit Miglustat, konnte ein verspätetes Einsetzen der Krankheitssymptome, verringerte Lipidakkumulation und Neurodegeneration, sowie eine Verbesserung der Motorik im *NPC1*^{-/-}-Tiermodell erzielt werden, während kein Einfluss auf kognitive Funktionen gesehen wurde (Davidson et al. 2009, Hovakimyan et al. 2013, Maas et al. 2015). Was bisher allerdings noch nicht untersucht wurde, ist der Einfluss einer solchen Langzeitbehandlung auf das Verhalten, die Motorik, das Schmerzempfinden und die körperliche Entwicklung von gesunden Wildtyptieren. Unter Verwendung gut etablierter Verhaltens- und Motoriktests, sowie eines Schmerztests soll in dieser Arbeit der Einfluss einer reinen Miglustatbehandlung, verglichen

mit der Kombinationsbehandlung aus Miglustat, Allopregnanolon und β -Cyclodextrin (Davidson et al. 2009) auf diese Parameter dargelegt und mögliche Nebenwirkungen in der Langzeitbehandlung aufzeigt werden.

1.2 Morbus Niemann-Pick Typ C

Die Ursache des NPC ist in 95 % der Fälle eine loss-of-function Mutation im *NPC1*-Gen, bezeichnet als Typ C1, und 5 % der Fälle durch eine Mutation im *NPC2*-Gen, bezeichnet als Typ C2. Klinisch unterscheiden sich beide Formen nicht, da beide zu einer Störung im intrazellulären Transport von Lipiden, vor allem Cholesterin, führen (Carstea et al. 1997, Neufeld et al. 1999, Vance 2006).

Die Prävalenz wird für Deutschland, Frankreich und das Vereinigte Königreich mit 0,66 bis 0,85 pro 100.000 Einwohner angegeben (Patterson et al. 2001, Vanier 2010), womit es sich laut aktuellen EU-Kriterien um eine seltene Krankheit handelt (http://ec.europa.eu/health/rare_diseases/policy/index_en.htm zuletzt aufgerufen am 14.10.2016). Diese Zahl schwankt aber sehr, so wurden für Australien, die Niederlande und Portugal Prävalenzen zwischen 0.25 und 2.20 pro 100.000 Einwohner angegeben (Meikle et al. 1999, Poorthuis et al. 1999, Pinto et al. 2004).

Erstbeschreiber des Morbus Niemann-Pick waren der deutsche Pathologe Ludwig Pick (1868-1944) und der deutsche Kinderarzt Albert Niemann (1880-1921). Später unterteilte Allen Crocker die Erkrankung anhand der hervorstechenden Merkmale in 4 Typen (Crocker 1961).

Typ A, die klassische infantile Form und gleichzeitig häufigste Form, mit Hepatomegalie und einer ab dem zweiten Lebensjahr einsetzenden Neurodegeneration, die meist innerhalb von zwei Jahren zum Tode führt.

Typ B, stellt eine viszerale Form dar, bei der das ZNS nicht betroffen und die Lebenserwartung nur geringfügig eingeschränkt ist. Typ A und B ist ein Mangel an saurer Sphingolmyelinase gemein, verursacht durch eine Mutation im *SMPD1*-Gen.

Typ C beschreibt die juvenile, subakute Form, jene Form, die in dieser Arbeit behandelt wird. Später wurde dieser Typus noch in die häufigere Unterform C1 und die seltenere Unterform C2 eingeteilt (Park et al. 2003).

Beim Typ D handelt es sich um die sogenannte die Nova Scotia Variante, benannt nach der kanadischen Provinz, in der dieser Typ zuerst vorkam. Allen an diesem Typ Erkrankten ist eine Verwandtschaft mit dem Paar Joseph Muise (ca. 1679–1729) und Marie Amirault (1684–ca. 1735) gemein, welche als Ursprung der D-Variante angesehen werden (Winsor 1978).

1.3 Klinik

Morbus Niemann-Pick Typ C, im Folgenden kurz NPC genannt, bietet ein sehr heterogenes Bild an Symptomen, das sowohl neurologische, psychiatrische und auch viszerale Veränderungen umfasst. Das Auftreten der verschiedenen Symptome ist dabei vom Alter des Patienten abhängig. Bei Neugeborenen tritt häufig eine cholestatische Hepathopathie auf. Ebenfalls kommt es früh zu einer Hepatosplenomegalie, wobei sich die Hepatomegalie mit zunehmendem Alter oft zurückbildet. Die Splenomegalie bleibt dagegen meist bis ins Erwachsenenalter bestehen.

Im frühen Kindesalter fallen die betroffenen Kinder durch Ungeschicklichkeit und eine verzögerte motorische Entwicklung auf. Im späten Kindesalter dagegen finden sich abnehmende Schulleistungen und eine generalisierte Unbeholfenheit. Zeigen sich motorische Symptome schon früh, kann es schon ab der 2. Hälfte des ersten Lebensjahres zu einem Stillstand der psychomotorischen Entwicklung kommen.

Ein weiteres wesentliches Symptom des NPC stellt die supranukleäre vertikale Blickparese dar. Sie ist ein Hinweis auf neurodegenerative Vorgänge im Hirnstamm. Der Patient ist nicht mehr in der Lage mit seinen Augen nach oben oder unten zu blicken, wobei das Verfolgen von bewegten Objekten in diese Richtungen noch möglich ist.

Weiterhin zeigen sich im späten Kindesalter Symptome der Kleinhirnbeteiligung, wie Ataxie mit erhöhter Sturzneigung, Dysmetrie, Dysarthrie und Anfallsleiden in Form von epileptischen und kataplektischen Anfällen. Veränderungen im Verhalten und der Impulskontrolle sind auch möglich (Mengel et al. 2012). Bei vielen Patienten bildet sich im Verlauf eine Dysphagie mit der Gefahr der Aspirationspneumonie aus (Patterson et al. 2012). Abbildung 1 zeigt das Auftreten der neurologischen Symptome nach dem Patientenalter.

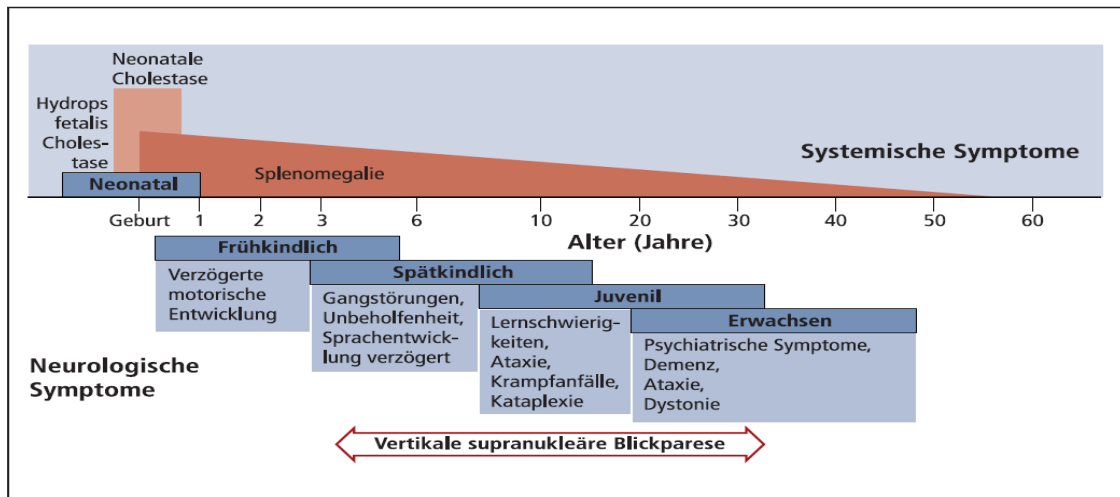


Abb. 1 Verlaufsstadien bei Niemann-Pick Typ C und ihre charakteristischen Symptome (nach Vanier 2010).

Bei Krankheitsbeginn im Jugend- und Erwachsenenalter stehen psychiatrische Symptome im Vordergrund. Diese umfassen schizophrenieähnliche Psychosen, Verhaltens- und Persönlichkeitsänderungen, Hypersexualität, Depression, bis hin zu demenziellen Symptomen, wie einem Rückgang der Gedächtnisfunktion und der Fähigkeit sich verbal zu äußern (Patterson et al. 2012).

1.4 Pathogenese

Morbus Niemann-Pick ist eine autosomal-rezessiv vererbte lysosomale Speicherkrankheit. In 95 % ist eine Mutation im *NPC1*-Gen die Ursache, nur 5 % der Fälle sind auf eine Mutation des *NPC2*-Gens zurückzuführen (Patterson et al. 2012). Während *NPC1* auf Chromosom 18q11 lokalisiert ist und für ein Glykoprotein mit einer Masse von 142 kD kodiert (Park et al. 2003), welches als Transmembranprotein für Lipide einen Weg durch die Endosomenmembran ermöglicht, liegt *NPC2* auf Chromosom 14q24.3 (http://www.hprd.org/summary?hprd_id=03008&isoform_id=03008_1&isoform_name= zuletzt aufgerufen am 14.10.16) und kodiert für ein endolysosomales Transportprotein.

Cholesterin wird in Form von LDL, low density Lipoprotein, dem Transportvehikel des Cholesterins, von den Zellen aufgenommen, welche dann durch die saure Lipase in den späten Endosomen hydrolysiert werden, um unverestertes Cholesterin freizusetzen. Anschließend wird es auf NPC2 geladen und zu NPC1 transportiert (Infante et al. 2008). NPC1 zusammen mit ORP5 transportieren dieses Cholesterin schließlich von der Endosomenmembran zur Membran des endoplasmatischen Retikulums (Du et al. 2011).

Eine Fehlfunktion von NPC1 oder NPC2 führt deshalb zu einer Akkumulation von Cholesterin in den Endosomen, wo aber auch andere Verbindungen wie Sphingomyelin,

Sphingosin oder bestimmte Glykolipide sich anhäufen. So akkumuliert Cholesterin im ZNS nur in geringem Umfang (Vanier 2010), dafür finden sich große Mengen an Glykolipiden, vor allem die Ganglioside GM2 und GM3 (Lloyd-Evans et al. 2008). Grund hierfür scheint eine Störung im zytoplasmatischen Transport der späten Endosomen zu sein.

Die Menge an Cholesterin in der Membran der späten Endosomen wird von ORP1L, einem Cholesterindetektor, erkannt. Abhängig von dieser Menge ändert ORP1L seine Konformation, um die Dynein-Dynactin- und HOPS-Komplexrekrutierung zu späten Endosomen über VAP-A, ein Protein des endoplasmatischen Retikulums, zu regulieren und damit Fusion und Richtung des Transports zu kontrollieren.

Im Falle von NPC1 akkumuliert Cholesterin in der Membran der späten Endosomen. Dies wird von ORP1L erkannt, wodurch dieses den HOPS- und Dynein-Dynaktinkomplex rekrutiert, was in einem verstärkten intrazellulären Transport zum Minusende der Tubuli und damit Richtung Soma der Zelle führt (Neefjes und van der Kant 2014). In Abbildung 2 werden diese Prozesse übersichtlich dargestellt.

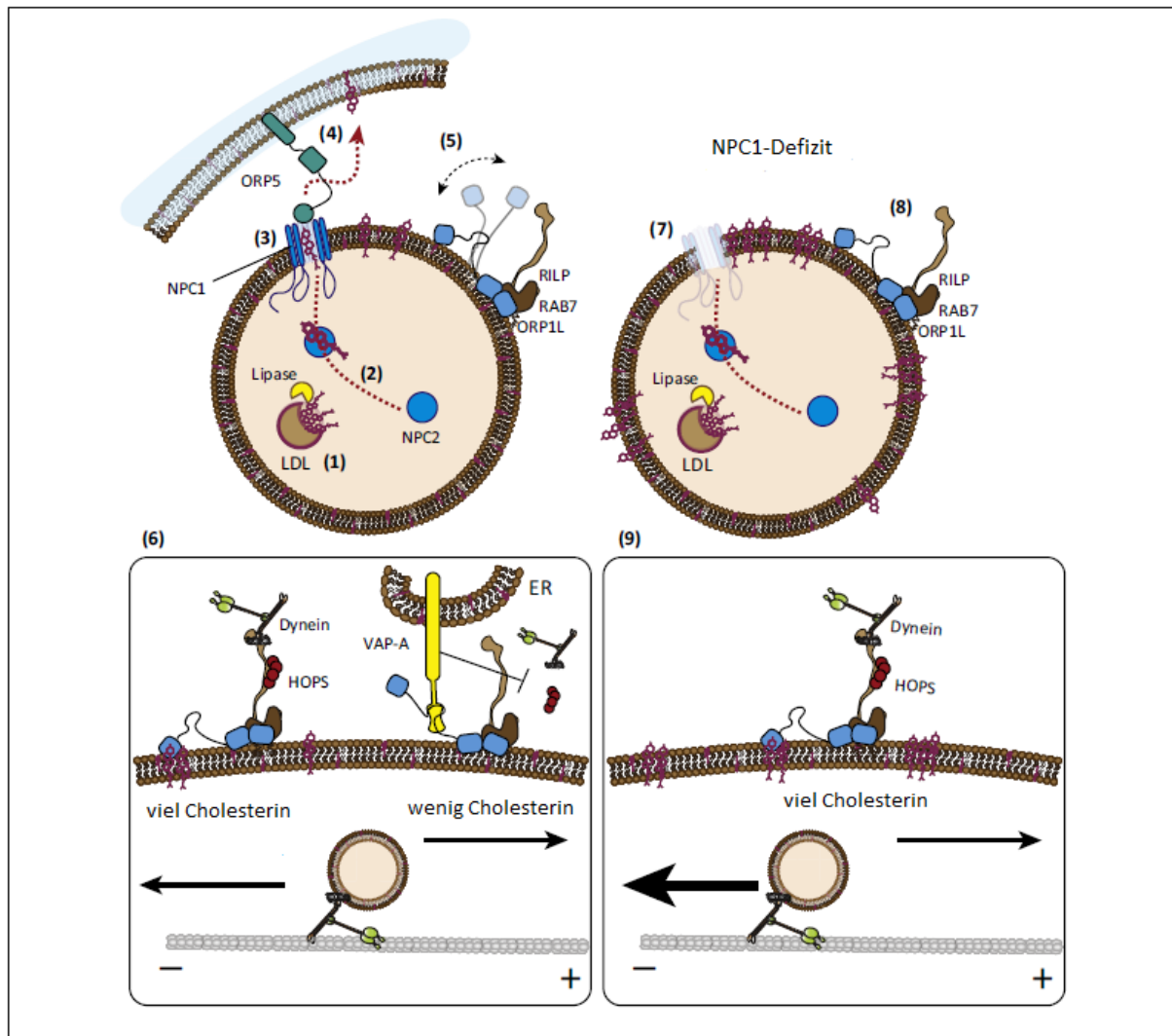


Abb.2 Lipase spaltet Cholesterin aus LDL (1), NPC2 wird mit Cholesterin beladen (2), Cholesterin wird von NPC2 durch die Endosomenmembran transportiert (3), ORP5 transportiert Cholesterin zum endoplasmatischen Retikulum (4), ORP1L ändert seine Konformation anhand des Gehalts an Cholesterin in der Endosomenmembran (5), ORP1L rekrutiert abhängig von seiner Konformation VAP-A oder HOPS und Dynein (6), NPC1-Defekt, Cholesterin akkumuliert in der Endosomenmembran (7), ORP1L erkennt große Mengen an Cholesterin in der Endosomenmembran (8) und rekrutiert HOPS und Dynein, woraus ein verstärkter Transport zum Minusende resultiert (9) (nach Neefjes und van der Kant 2014).

Neben Cholesterin kommt es auch zu einer Akkumulation des fettlöslichen Vitamin E in den späten Endosomen bzw. Lysosomen, wodurch es dem normalen Zellmetabolismus nicht mehr zur Verfügung steht (Vazquez et al. 2012). Vitamin E oder α -Tocopherol wirkt vor allem als Antioxidans, so schützt es ungesättigte Fettsäuren in Membranlipiden, Lipoproteine und Depotfett vor einer Zerstörung durch Oxidation. Gerade das Kleinhirn enthält viel Vitamin E (Serra et al. 2006), ein Hirnbereich der bei NPC besonders schwer betroffen ist. Der Mangel an α -Tocopherol und die verminderte Aktivität verschiedener antioxidativ wirkender Enzyme verursacht vor allem in Neuronen vermehrten oxidativen Stress, da diese einen besonders hohen Gehalt an ungesättigten Fettsäuren aufweisen, was über längere Zeit zum Zelltod führt.

Gleichzeitig nehmen Neurone aufgrund ihres hohen Energieumsatzes viel Sauerstoff auf, bei nur geringen Möglichkeiten sich vor oxidativem Stress zu schützen. So verfügen sie zum Beispiel über niedrigere Reserven an reduziertem Glutathion (Dringen 2000). Der bei NPC stärkere oxydative Stress aktiviert schließlich u.a. den proapoptotisch wirkende c-Abl/p73 Zellmechanismus (Vazquez et al. 2012), was zum Gewebeuntergang führt. Mangel an antioxidativem Glutathion wurde auch in den Mitochondrien festgestellt. Mitochondriales Glutathion (mGSH) stellt einen der wichtigsten Schutzmechanismen gegen die bei den physiologischen Abläufen entstehenden ROS (reactive oxygen species) dar. Marí et al. beschreiben einen Mangel an mGSH in den Lebern von NPC1^{-/-}-Mäusen, bei gleichzeitig normalen Zytosolspiegeln (Marí et al. 2006). Dieser Mechanismus und die Akkumulation von Cholesterin führen zu einer herabgesetzten Funktion der Mitochondrien mit schlechterer Energieversorgung der Zelle. Gleichzeitig entstehen höhere Spiegel an ROS. Eine weitere Quelle für höhere ROS-Spiegel stellt eine verminderte Aktivität der peroxisomalen Katalase dar. Katalase ist ein Enzym, das vor allem für die Regulierung der zellulären Wasserstoffperoxidspiegel (H₂O₂) verantwortlich ist. Niedrige H₂O₂-Spiegel führen zu einer Stabilisierung der Katalase durch Phosphorylierung durch c-Abl. Hohe H₂O₂-Spiegel oder anhaltenden proapoptotischen Stimuli führen zum Transport von c-Abl in den Zellkern, wo es seine proapoptotische Wirkung entfaltet, ohne die Katalase zu stabilisieren, die daraufhin abgebaut wird (Cao et al. 2003, Rhee et al. 2005). Folge der verminderten Katalaseaktivität sind höhere Spiegel an ROS. Neben erhöhten ROS-Spiegeln und einem α -Tocopherolmangel findet sich in NPC1^{-/-}-Leberzellen auch mehr Kupfer (Cu), als dies physiologisch zu erwarten wäre (Yanagimoto et al. 2009, 2011). Hohe Kupferspiegel werden ebenso wie hohe Eisen- oder Zinkspiegel als Risikofaktor für Zellschäden durch oxydativen Stress bei neurodegenerativen Erkrankungen wie amyotropher Lateralsklerose, Alzheimer und Parkinson angesehen (Barnham und Bush 2008). Abbildung 3 zeigt zusammenfassend den Pathomechanismus durch oxydativen Stress.

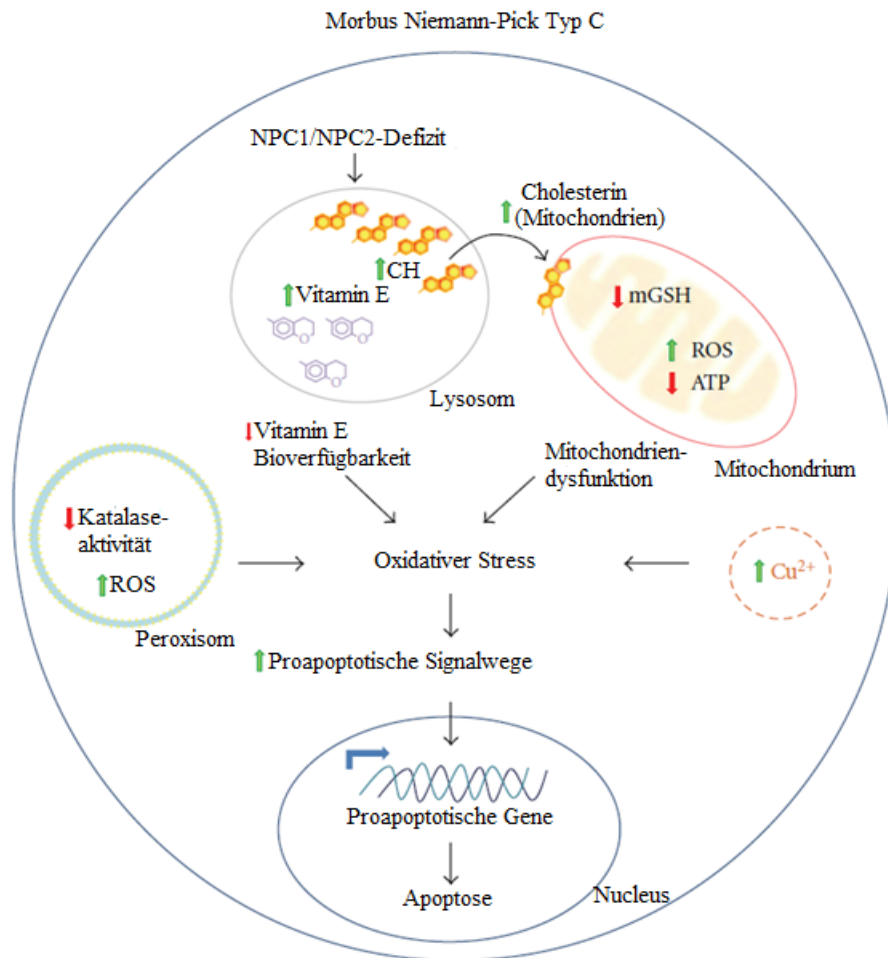


Abb.3 Der Mangel an NPC1 und NPC2 führt zur Akkumulation von Cholesterin (CH) und Vitamin E (α -Tocopherol) in den Lysosomen, wodurch es dem Zellmetabolismus nicht mehr als Antioxidans zur Verfügung steht. Cholesterin findet sich auch vermehrt in den Mitochondrien, wo es zu niedrigeren Spiegeln an mitochondrialen Glutathion (mGSH) führt. Daraus resultiert eine Zunahme an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in den Mitochondrien mit verminderter ATP-Produktion. Der dadurch entstehende oxydative Stress führt zu einer geringeren Katalaseaktivität in den Peroxisomen, was wiederum eine Zunahme von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zur Folge hat. Erhöhung des Kupferspiegels (Cu) intrazellulär verstärkt den oxydativen Stress ebenfalls, was über die Aktivierung proapoptotischer Signalwege zum Zelltod durch Apoptose führt (nach Vazquez et al. 2012).

Neben Cholesterin kommt es auch zu einer Akkumulation von Sphingolipiden. Für Ceramid konnte eine proapoptotische Wirkung gezeigt werden (Gomez-Muñoz et al. 2015). Diese Akkumulation stört das so genannte Sphingolipidreostat, dass bei der Entscheidung, ob Zellen überleben oder in Apoptose gehen eine wichtige Rolle spielt (Sanllehí et al. 2015, Pyne et al. 2015).

1.5 Auswirkungen auf die Hirnstruktur

Wie bei allen neurodegenerativen Erkrankungen geht auch NPC mit einem Verlust an Neuronen einher. So wurden im Tiermodell ein Verlust an Purkinjezellen der Kleinhirnrinde von bis zu 96 % und ein Gliazellenverlust von 63 % allein in den ersten elf Lebenswochen beschrieben (German et al. 2001). Folge dieses Neuronenverlusts sind Symptome wie Ataxie, Tremor, Dysphagie und Dysarthrie. Makroskopisch zeigt sich eine Volumenabnahme des Cerebellums. Doch nicht nur das Kleinhirn ist von diesem Neuronenverlust betroffen. German und Mitarbeiter beschreiben weiterhin einen Verlust an Gliazellen im Bereich des Corpus callosum von 50 %, außerdem wurden ein nahezu vollständiger Verlust der Myelinisierung und ein Axonreduktion von 30 % im Corpus callosum festgestellt (German et al. 2002).

Es scheint u.a. zu Fehlern in der Differenzierung von Oligodendrozyten und bei der Myelinisierung im ZNS zu kommen. Es konnte gezeigt werden, dass bei NPC1 eine signifikante Abnahme des Myelin Gene Regulatory Factors (MRF) besteht, welcher wichtig für die Bildung und Aufrechterhaltung von Myelinscheiden ist (Yan et al. 2011).

Vergleichende MRT-Aufnahmen von an NPC Erkrankten und Gesunden zeigten signifikante Volumenreduktionen im Bereich des Striatum, Thalamus und Hippocampus, wobei vor allem die Volumenreduktion im Bereich des linken Hippocampus mit erreichtem Symptomscore und Einschränkung der Kognition korreliert (Walterfang et al. 2013). Neben der Abnahme des Hirnvolumens durch Neuronenverlust finden sich in menschlichen Gehirnen auch „neurofibrillary tangles“, NFTs genannt (Zhang et al. 2010). Dabei handelt es sich um Veränderungen, wie man sie auch beim Morbus Alzheimer findet. Diese NFTs sind bündelförmige Proteinablagerungen, die aus abnormalem, hyperphosphoryliertem, Mikrotubuli-assoziiertem Tau-Protein bestehen.

1.6 Therapie

Eine kausale Therapie des Morbus Niemann-Pick Typ C ist derzeit nicht verfügbar. Das einzige aktuell zugelassene Medikament ist seit 2009 Miglustat. Unter Miglustat konnten im Tierversuch ein verspätetes Einsetzen der Neurodegeneration und ein um 20 % verlängertes Überleben beobachtet werden (Zervas et al. 2001). Nachdem Miglustat schon 2001 für die Therapie des Morbus Gaucher Typ I zugelassen wurde war, wurde es 2009 in Europa für die Therapie des Morbus Niemann-Pick Typ C zugelassen (http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000435/human_med_001171.jsp&mid=WC0b01ac058001d124 zuletzt aufgerufen am 14.10.16). Beim

Menschen konnte unter Miglustattherapie in 72 % der Fälle ein Fortschreiten der Erkrankung verhindert werden (Vanier 2010).

Im Tiermodell hat weiterhin Cyclodextrin eine positive Wirkung zeigen können (Davidson et al. 2009), besonders in Kombination mit Miglustat und Allopregnanolon. Erste Anwendungen von Cyclodextrin am Menschen zeigten eine teilweise Reduktion der Hepatosplenomegalie und Besserung der zentralnervösen Funktion (Matsuo et al. 2013). Intrathekal verabreicht zeigt es gute Effekte hinsichtlich des Krankheitsprogresses (Maarup et al. 2015).

Eine weitere häufig untersuchte Substanz ist das oben genannte Allopregnanolon, welches aber nur in Verbindung mit Cyclodextrin einen positiven Effekt auf den Krankheitsverlauf zu haben scheint (Davidson et al. 2009).

1.6.1 Miglustat (Handelsname Zavesca®)

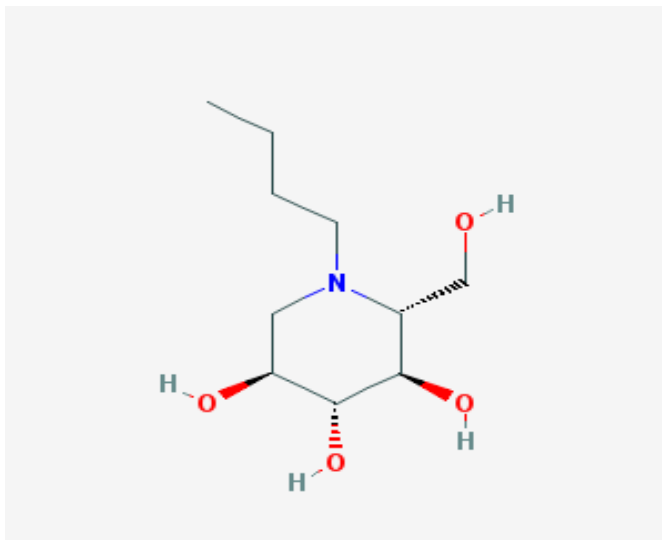


Abb.4 Strukturformel von Miglustat ($C_{10}H_{21}NO_4$) (Pub Chem, URL: http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=51634&loc=ec_rcs zuletzt aufgerufen am 14.10.16).

Miglustat oder *N*-butyl-deoxynojirimycin ist ein alkylierter Iminozucker, der als Glucoseanalogon einen reversiblen Inhibitor der Glucosylceramidsynthese darstellt. Durch die Hemmung der α -Glucosidase I und II sowie des ersten Schritts der Glucosylceramidsynthese können die Zellen weniger Glucosylceramide produzieren (Treiber et al. 2007). Miglustat ist in der Lage die Bluthirnschranke zu überwinden und wurde bereits 2001 im NPC-Tiermodell zur Substratreduktionstherapie erfolgreich eingesetzt. Die damit behandelten NPC1^{-/-}-Tiere zeigten ein deutlich späteres einsetzen der neurologischen Symptomatik und ein verlängertes Überleben, was auf eine verminderte Anhäufung von GM2- und GM3-Gangliosiden im Cortex zurückgeführt wurde (Zervas et al. 2001). Abbildung 5 zeigt, wo die Wirkung von Miglustat ansetzt.

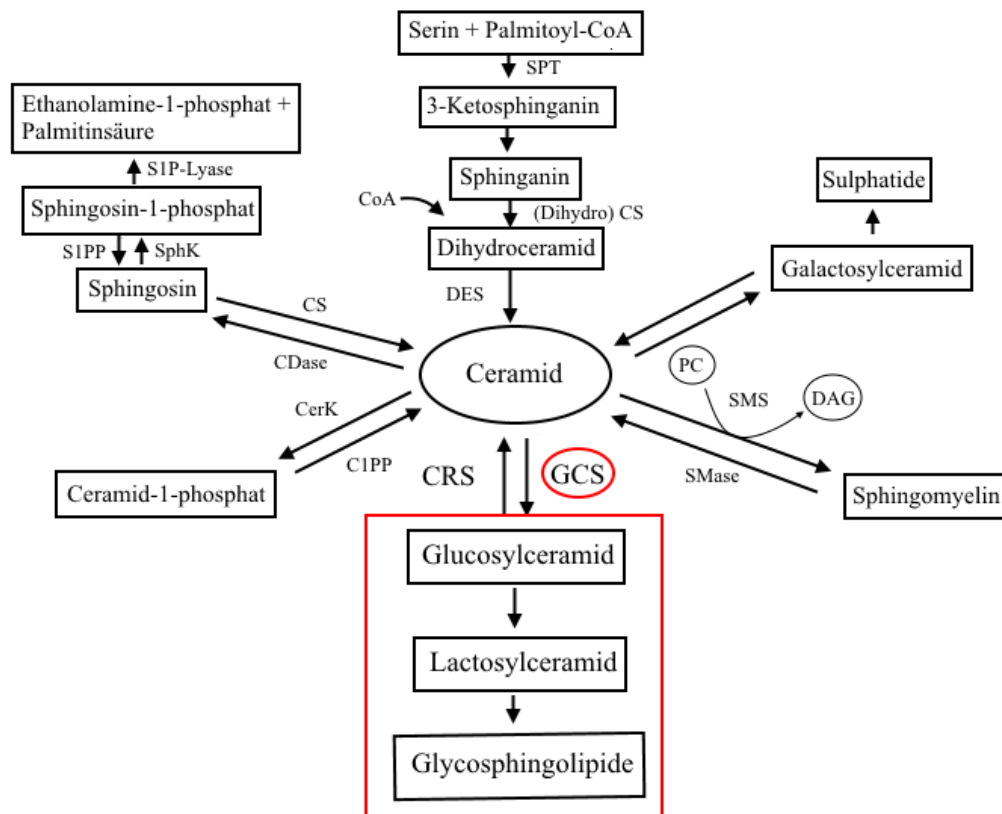


Abb.5 Ceramide und deren Abkömmlinge sind für die Entwicklung des Nervensystems von unverzichtbarem Wert. Rot umrandet sind zum einen die Glucosylceramidsynthase (GCS), die durch Miglustat blockiert wird, sowie die weiteren Verbindungen, die durch Miglustatgabe in geringem Umfang synthetisiert werden können.

SPT - Serinpalmitoyltransferase, CS - Ceramidsynthase, CoA - Coenzym A, DES - Desaturase, PC - Phosphatidylcholin, SMS - Sphingomyelinsynthase, DAG - Diacylglycerol, SMase - Sphingomyelinase, GCS - Glycosylceramidsynthase, CRS - Cerebrosidase, C1PP - Ceramid-1-phosphatphosphatase, CerK - Ceramidkinase, CDase - Ceramidase, CS - Ceramidsynthase

In einer prospektiven, randomisierten Kontrollstudie am Menschen konnten Patterson und Mitarbeiter 2007 erstmals einen positiven therapeutischen Effekt feststellen. In dieser Studie wurden 29 Patienten (über 12 Jahre alt) und eine pädiatrische Gruppe von 12 Kindern (unter 12 Jahre alt) über einen Zeitraum von 12 Monaten, mit der Möglichkeit zur Verlängerung der Behandlung, untersucht. Das Hauptaugenmerk wurde dabei auf horizontal sakkadierenden Augenbewegungen gelegt, da deren Geschwindigkeit mit dem Krankheitsprogress korreliert. Es zeigte sich, dass Miglustat viele klinische Manifestationen von NPC stabilisiert oder sogar mildert (Patterson et al. 2007). Untermauert wurde dieses Studienergebnis in einer multizentrischen, retrospektiven Kohortenstudie von 2009, in der eine Stabilisierung von Sprachvermögen, Schluckfähigkeit, des Gangbildes und der Handgeschicklichkeit beobachtet werden konnte (Pineda et al. 2009).

Zu den häufigen Nebenwirkungen von Miglustat gehören gastrointestinale Nebenwirkungen wie Durchfall aufgrund der Hemmung von Glucosidasen im Darm, Gewichtsverlust, neurologische Nebenwirkungen wie zentrale und periphere Neuropathie, Tremor, Muskelkrämpfe, Erschöpfung, Depression, Schlaflosigkeit und Thrombozytopenie (Fachinformation Zavesca[®], Pineda et al. 2010, Wraith et al. 2010). Die Ausscheidung erfolgt größtenteils über die Nieren (Fachinformation Zavesca[®]).

1.6.2 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin

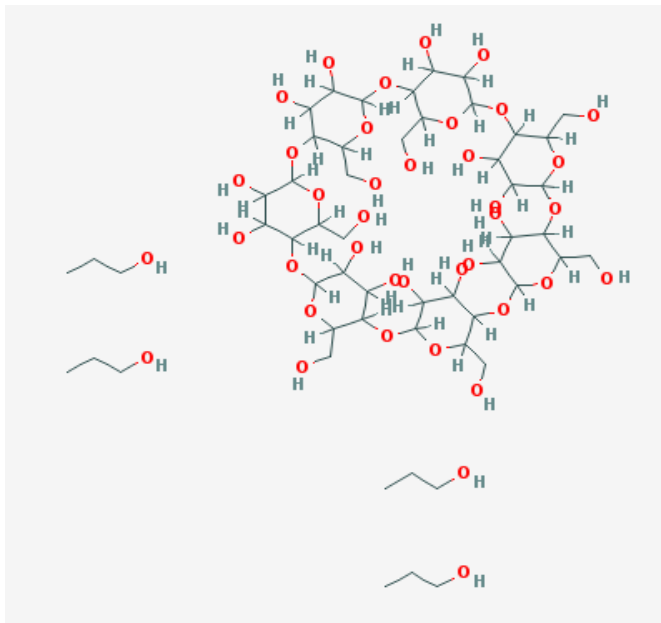


Abb.6 Strukturformel 2-Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin ($C_{54}H_{102}O_{39}$) (Pub Chem, URL: http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=44134771&loc=ec_rcs zuletzt aufgerufen am 14.10.16).

Cyclodextrine wurden 1891 erstmals von A. Villiers isoliert und 1903 von Scharinger als Oligosaccharide erkannt (Villiers 1891). Bei Cyclodextrinen handelt sich um eine Gruppe von zyklischen Oligosacchariden, denen gemein ist, dass sie eine hydrophobe Kavität und eine polare Außenfläche besitzen. Durch die hydrophobe Kavität ist es möglich schlecht wasserlösliche Verbindungen durch die Bildung einer sogenannten Einschlussverbindung in eine wasserlöslichere Form zu überführen. Aufgrund dieser Eigenschaft werden Cyclodextrine vielfältig eingesetzt. Man findet sie in der Lebensmittelindustrie, in Raumluftfrischern und vor allem in der Pharmakaproduktion zur Überführung hydrophober Substanzen in eine hydrophilere Form. Durch die Ummantelung von Pharmaka durch Cyclodextrin ändern sich deren chemische, physikalische und biologische Eigenschaften (z.B. Anstieg der Wasserlöslichkeit, längere Wirkdauer durch verzögerte Freisetzung, etc.). Im Fall von NPC wurde 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin zunächst als Transportvehikel für

Allopregnanolon in der by-product replacement therapy, kurz BRT, eingesetzt, da man davon ausging, dass eine Substitution von fehlenden oder funktionsbeeinträchtigten Verbindungen wie Allopregnanolon zu einer verbesserten Zellfunktion führen würde. In diesem Rahmen konnte aber auch eine positive Wirkung des 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin für sich erkannt werden. Zur Vereinfachung wird im Rest der Arbeit nur von „Cyclodextrin“ gesprochen, gemeint ist aber stets 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin.

Schon einmalige Gaben von Cyclodextrin führten zu einer Verlängerung des Überlebens, mehrmalige Gaben führen zu einem noch besseren Effekt. Es wurde in diesem Zusammenhang eine Verringerung der intraneuralen Cholesterin- und Gangliosid-, sowie der freien Sphingosinakkumulation nachgewiesen (Davidson et al. 2009, Liu et al. 2009). Cyclodextrin setzt das in späten Endosomen bzw. Lysosomen sequestrierte Cholesterin frei, wodurch es dem normalen Zellmetabolismus zugeführt werden kann. Des Weiteren konnte durch Cyclodextringabe eine Wiederherstellung der Mitochondrienfunktion gezeigt werden (Yu et al. 2005). Durch das Freiwerden von Cholesterin nimmt außerdem die gesteigerte endogene, hepatische Cholesterinsynthese ab (Liu et al. 2009, Vance und Peake 2011). Unklar bleibt bisher, wie Cyclodextrin bei intravenöser Gabe auf das zentrale Nervensystem wirken kann, da es nicht in der Lage ist die Bluthirnschranke zu überwinden (Pontikis et al. 2013).

Erste Anwendungen am Menschen zeigen bei systemischer Gabe vor allem eine Wirkung auf die Hepatosplenomegalie (Matsuo et al. 2013). Erst in hohen Dosen konnten Effekte auf die neurologische Symptomatik erzielt werden, was mit erhöhter Lungentoxizität einhergeht, wie der Fall eines Patienten zeigt, der wenige Tage nach Gabe einer Cyclodextrininfusion Verschattungen der Lunge zeigte (Matsuo et al. 2013). Im Tierexperiment an Schweinen konnte in Folge dieses Ereignisses gezeigt werden, dass ein Zusammenhang zwischen schweren Lungenentzündungen und früher Lungenfibrosierung mit Cyclodextrininfusionen besteht (Chien et al. 2013). Intrathekale Anwendungen hingegen umgehen die Bluthirnschranke und konnten gute Ergebnisse in Hinblick auf den Krankheitsprogress erbringen (Maarup et al. 2015). Vite et al. konnten 2015 zeigen, dass die intrathekale Anwendung im Tiermodell mit Katzen den Beginn der Erkrankung stark verzögern kann und bei bereits eingetretenen Krankheitssymptomen diese stabilisiert und die Überlebenszeit verlängert (Vite et al. 2015). Cyclodextrin wird generell gut vertragen, beim Menschen konnte Diarrhö bei oraler Gabe als häufige Nebenwirkung festgestellt werden (Gould und Scott 2005). Intrathekal angewendet kommt es zu einem teilweisen Hörverlust bei Mensch und Tier (Maarup et al. 2015, Vite et al. 2015), welcher durch die Verwendung von weniger

ototoxischen Cyclodextrinen wie HP γ -Cyclodextrin reduziert werden kann (Davidson et al. 2016).

1.6.3 Allopregnanolon

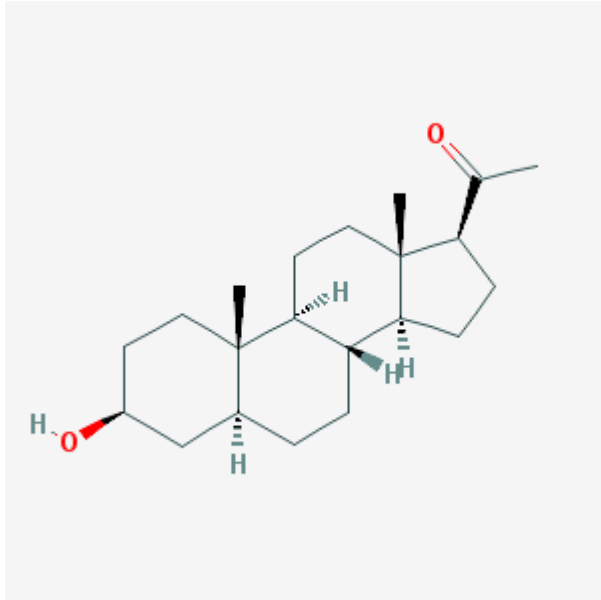


Abb.7 Strukturformel Allopregnanolone ($C_{21}H_{34}O_2$) (Pub Chem, URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/31402>; CID 31402, zuletzt aufgerufen am 14.10.2016).

Allopregnanolon ist ein endogenes, inhibitorisch wirkendes Neurosteroid. Es wird durch die 5 α -Reductase Typ I und die 3 α -Hydroxysteroiddehydrogenase aus Progesteron über einen Zwischenschritt synthetisiert und wirkt stark als positiver Modulator des GABA_A-Rezeptors. Über diesen Rezeptor wirkt es u.a. anxiolytisch, sedierend und antikonvulsiv (Reddy 2010). Im Tiermodell konnte nachgewiesen werden, dass in den Hirnen von NPC^{-/-}-Mäusen mit zunehmendem Alter weniger Neurosteroid gebildet werden, als das bei Wildtypen der Fall ist. Ursache ist eine Abnahme von 5 α -Reductase und 3 α -Hydroxysteroiddehydrogenase, vor allem im Bereich des Kleinhirns (Griffin et al. 2004). Vor Bekanntwerden der Wirksamkeit des Cyclodextrins glaubte man, dass bereits die einmalige Gabe von Allopregnanolon in der Neugeborenenphase den Beginn der neurologischen Symptomatik verzögert, das Überleben von Purkinje- und Körnerzellen verlängert und die Akkumulation von GM2 und GM3 Gangliosiden verringert, bei mehrmaliger Gabe wirkte es sogar noch besser (Griffin et al. 2004).

Aufgrund der schlechten Löslichkeit muss Allopregnanolon an ein Transportmedium gebunden werden. Hierfür wird Cyclodextrin verwendet. Davidson et al. konnten 2009 nachweisen, dass Allopregnanolon nur in Verbindung mit Cyclodextrin verabreicht eine Wirkung entfaltet. Reine Allopregnanolongaben zeigten keinen positiven Effekt, weshalb

davon ausgegangen wird, dass die Hauptwirkung von Cyclodextrin ausgeht und Allopregnanolon nur einen geringen Anteil daran hat. Dies wird durch eine die Arbeit von Liu et al. 2009, in welcher nur Cyclodextrin verabreicht wurde, untermauert.

Weiterhin ist Allopregnanolon im Tiermodell an der Myelinisierung von peripherem und zentralem Nervensystem durch Gliazellen beteiligt (Baulieu und Schumacher 2000) und hat protektive Eigenschaften bei oxydativem Stress (Zampieri et al. 2009), sowie bei Hirnverletzungen (Ishrat et al. 2010). Als stark positiver GABA_A-Rezeptormodulator besitzt es anxiolytische und sedierende Eigenschaften (Reddy 2010), kann jedoch auch anxiogen wirken. Dies wird durch eine U-förmige Dosis-Wirkungskurve bedingt, bei der Allopregnanolon in niedrigen und hohen Konzentrationen an die GABA_A-Rezeptoren binden kann, während dies bei mittelhohen Konzentrationen, die beim Menschen in der Lutealphase der Frau erreicht werden, nicht möglich ist (Bäckström et al. 2011).

1.6.4 weitere Therapieansätze

Eine Studie zum Zusammenspiel von Cholesterin und Sphingolipiden bei NPC konnte ein Defizit an saurer Shpingomyelinase, trotz intaktem Gen bei Niemann-Pick Typ C nachweisen. Eine Substitution erbrachte niedrigere Cholesterin- und Bismonoacylglycerolphosphat Spiegel bei NPC1 und NPC2. Gleichzeitig mit der Normalisierung der Shingomyelinaseaktivität verbesserte sich auch die Zellfunktion (Devlin et al. 2010).

Unspezifische, chemische Chaperone werden bei einer Reihe von Proteinfehlfaltungserkrankungen und lysosomalen Speicherkrankheiten als mögliche Therapie erachtet (Balch et al. 2008). In einer Studie an Zellkulturen konnte durch die verbesserte Faltung eines NPC1-Proteins eine bessere Zellfunktion und eine geringe Ausprägung der Krankheitsmerkmale gezeigt werden (Gelsthorpe et al. 2008).

In einer weiteren Studie wurden neun verschiedene Substanzen in vitro auf ihre Potenz die Cholesterinakkumulation zu verringern, getestet. Dabei konnten Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin, Methyl- β -Cyclodextrin und δ -Tocopherol signifikante Effekte zeigen. Wurde Cyclodextrin mit δ -Tocopherol kombiniert, konnten synergistische Effekte gezeigt werden. Diese waren so ausgeprägt, dass es die zehnfache Dosis Cyclodextrin gebraucht hätte, um denselben Effekt zu erzielen (Yu et al. 2014). Eine Vitamin E reiche Diät konnte im Mausmodell positive Effekte auf Lebensspanne und Symptombeginn zeigen (Marin et al. 2014)

Eine Studie an *NPC1*^{-/-}-Mäusen konnte einen günstigen Effekt durch den c-Abl-spezifischen Inhibitor Imatinib zeigen. Durch die Hemmung des proapoptotischen c-Abl/p73 Systems konnte ein längeres Überleben der Purkinjezellen, eine generell geringere Apoptoseaktivität im Cerebellum, eine Besserung der neurologischen Symptomatik und ein längeres Gesamtüberleben erzielt werden (Alvarez et al. 2008).

Eine weitere Möglichkeit der Behandlung des NPC scheint in der Kombination von Miglustat mit Ibuprofen und Curcumin zu liegen. Miglustat reduziert die Bildung und Akkumulation von Glycosphingolipiden, Ibuprofen reduziert die Aktivierung von Microgliazellen und Inflammation im ZNS und Curcumin erhöht die intrazelluläre Kalziumkonzentration. Mit dieser Kombinationsbehandlung konnte die Zeit bis zum Einsetzen von Gewichtsverlust und motorische Einschränkungen bei *NPC1*^{-/-}-Tieren verlängert werden. Des Weiteren konnte ein verspätet Einsetzen des Purkinjezellverlusts beobachtet werden (Williams et al. 2014).

Abschließend sollen noch Inhibitoren der Histondeacetylasen genannt sein. Alam et al. konnten eine Verlängerung der Lebenszeit von 4 auf 9 Monate und ein verspätet Einsetzen der neurologischen Symptomatik beobachten. Dabei verwendeten sie eine Kombination aus Vorinostat, einem Histondeacetylaseinhibitor, 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HPBCD) und Polyethylenglycol (Alam et al. 2016).

1.7 Tiermodelle

Da es sich bei NPC um eine seltene Erkrankung handelt, sind Studien an Menschen oder mit menschlichem Gewebe aufgrund der schlechten Verfügbarkeit schwierig. Allerdings sind Studien, um ein verwertbares statistisches Ergebnis zu erzielen, auf eine gewisse Mindestzahl an Teilnehmern angewiesen, was bei der geringen Prävalenz der Erkrankung aber sehr schwierig ist. Daher ist die Forschung auf Tierversuche mit Modellen, die die Erkrankung nachahmen, angewiesen. Zu diesem Zweck gibt es mittlerweile mehrere Mauslinien, die aufgrund verschiedener Mutationen eine NPC ähnliche Erkrankung ausbilden. Zuerst beschrieben und am häufigsten angewendet wird das BALB/c Mausmodell mit einer Spontanmutation im *Niemann-Pick Typ C1 NIH Allel*, in dessen Folge es bei Homozygotie zum Mangel an Sphingomyelinase und Glucocerebrosidase kommt. Daraus resultierend häufen sich Sphingomyelin und Glucocerebroside ähnlich dem humanen NPC im Gewebe an (Pentchev et al. 1980). Die Tiere zeigen u.a. Cornea- und Retinadefekte (Hovakimyan et al. 2011 bzw. 2013), olfaktorische und trigeminale Beeinträchtigungen (Yan et al. 2014), sowie im Verlauf aufgrund ausgeprägter Kleinhirndegeneration mit fast vollständigem Purkinjezellverlust von 96 %, ataktische Bewegungsstörungen und versterben frühzeitig im

Alter von 2,5 bis 4 Monaten (Higashi et al. 1993, Morris et al. 1982). Es wird vermutet, dass unter anderem eine bei *NPCI*^{-/-}-Mäusen im Verlauf verringerte Bildung von δ -Protocadherinen hier eine Rolle spielt (Yan et al. 2014). Auch im Bereich des Rückenmarks zeigen diese Tiere axonale Veränderungen, sowie eine erhöhte Gliazellaktivität (Yan et al. 2014).

Weiterhin gibt es eine Linie (C57BLKS/J-*Npc1*^{spm}/J), ebenfalls eine Spontanmutation, die dem BALB/c Mausmodell im Phänotyp sehr ähnlich ist (Miyawaki et al. 1982).

Seit 2012 existiert auch ein Mausmodell mit einer Punktmutation, die zu einem Austausch von Aspartat zu Glycin führt. Die Tiere zeigen normale Spiegel an *NPCI*-mRNA, aber herabgesetzte Spiegel an NPC1-Protein. Die Symptomatik entwickelt sich bei diesem Mausmodell insgesamt langsamer, was dieses Modell zur Erforschung der später einsetzenden Formen von NPC prädestiniert (Maue et al. 2012).

Des Weiteren gibt es Modelle, die Katzen nutzen (Vite et al. 2015).

Die für diese Arbeit eingesetzten Tiere sind Wildtypen der am häufigsten verwendeten BALB/c Nctr-Npc1m1N/J-Linie.

1.8 Ziel der Arbeit und Fragestellungen

Miglustat ist das einzige zugelassene Medikament für die Behandlung des NPC. Die Kombinationsbehandlung, bestehend aus Miglustat, Allopregnanolon und Cyclodextrin scheint eine weitere Verbesserung in der Behandlung des NPC zu sein. Bisher wurden beide pharmakologischen Möglichkeiten hauptsächlich an Erkrankten bzw. Mutanten erprobt. Wie wirken sie sich aber auf die Entwicklung von Verhalten, Motorik, Schmerzempfinden und Gewicht bei völlig gesunden Tieren aus? Diese Fragen sollen in dieser Arbeit beantwortet werden. Als Orientierung wurden folgende Fragen formuliert:

1. Hat Miglustat oder die Kombinationsbehandlung von Miglustat zusammen mit Allopregnanolon und Cyclodextrin einen Einfluss auf das Verhalten und die Emotionalität bei BALB/c Wildtypmäusen?
2. Beeinflusst das sedierende Neurosteroid Allopregnanolon gelöst in Cyclodextrin als Teil der Kombinationsbehandlung das Verhalten der Tiere oder die Wirkung von Miglustat?
3. Findet sich wie in der Fachinformation zu Miglustat beschrieben ein Einfluss auf das periphere Nervensystem in Form einer peripheren Neuropathie? Tritt diese eventuell auch bei der Kombinationstherapie auf?
4. Hat Miglustat oder die Kombinationstherapie einen Einfluss das Körper- und Hirngewicht gesunder Tiere, vor dem Hintergrund der Membransynthesehemmung durch Miglustat oder den in der Literatur beschriebenen Lipidspiegel vermindernenden Effekt von Cyclodextrin?
5. Kann schon allein der Schmerz- bzw. Injektionsreiz Veränderungen in Verhalten oder Motorik hervorrufen?

2. Methoden

2.1 Versuchstiere

Bei den Versuchstieren handelte es sich um Wildtypen der Mauslinie BALB/c Nctr-Npc1m1N/J, welche nicht erkranken.

Es wurden schwangere Weibchen von Charles River Laboratories, RMS, Germany GmbH (Sandhofer Weg 7, 97633 Sulzfeld, Bayern) bezogen, deren männlichen Nachkommen für die Experimente benutzt wurden. Bis zum 23 Tag (P23) nach ihrer Geburt verblieben die Tiere bei ihren Müttern und wurden von diesen ernährt, danach erfolgte das Umsetzen in eigene Käfige. Ab dem siebten postnatalen Tag (P7) begann die intraperitoneale Behandlung. Im Fall von Miglustat wurde diese an P23 auf eine orale Gabe mit dem Futter umgestellt. Im Tierstall wurden sie bei einer Temperatur von ca. 22 °C, konstanter Luftfeuchtigkeit und einer künstlichen Beleuchtung mit programmiertem 12 Stunden hell/dunkel Rhythmus in kleinen Gruppen gehalten. Alle durchgeführten Experimente und vorgenommenen Prozeduren wurden vom zuständigen Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern genehmigt (Versuchs-ID: 7221.3-1.1–088/10) und wurden nach den gültigen gesetzlichen Bestimmungen durchgeführt.

Um einen Einfluss von Miglustat, der Kombination von Miglustat, Allopregnanolon und Cyclodextrin, sowie einer Scheinbehandlung zu untersuchen, wurden die Tiere in zunächst vier Gruppen unterteilt.



Abb.8 Zwei männliche Versuchsmäuse der Gruppe Miglu in ihrem Käfig.

Die erste Gruppe, genannt Sham 1, bestand aus 15 männlichen Tieren, die Scheininjektionen, d.h. lediglich den Einstich, erhielten. Die zweite Gruppe, Sham 2, bestand aus 14 männlichen Tieren und erhielt Injektionen mit physiologischer Kochsalzlösung (0,9 % NaCl). Dies geschah nach demselben Schema, wie auch die Kombitiere behandelt wurden. Die Injektionen begannen ab P7 und wurden bis zum Ende des Experiments fortgeführt. Ab P23 erhielten diese Tiere normale Futterpellets ohne Medikamentenzusatz.

Da bei den Tests kein signifikanter Unterschied zwischen den Tieren der beiden Shamgruppen bestand, wurden diese bei der Datenauswertung zu einer Gruppe „Sham“ zusammengefasst, weshalb im Rest der Arbeit nur noch von einer Shamgruppe die Rede ist und die Abbildungen nur drei Gruppen zeigen.

Die dritte Gruppe, Kombi, bestand aus 26 männlichen Tieren, welche eine Kombinationsbehandlung mit Miglustat, Allopregnanolon und Cyclodextrin erhielten. Allopregnanolon und Cyclodextrin wurden ab P7 einmal pro Woche und Miglustat ab P10 täglich bis P22 intraperitoneal verabreicht. An P23 erfolgte die Umstellung von Miglustat auf peroral über das Futter.

Die vierte Gruppe, Miglu, bestand aus 27 männlichen Tieren, welche eine reine Miglustatbehandlung erhielten. Wie bei der Gruppe Kombi erhielten die Tiere ab P10 eine tägliche intraperitoneale Injektion von Miglustat bis P22 und wurden an P23 auf die perorale Gabe umgestellt. Die Gruppe erhielt weder Cyclodextrin noch Allopregnanolon, dafür die entsprechenden Vehikelinjektionen.

Trinkwasser stand den Tieren jederzeit zur Verfügung.

2.2 Pharmakologische Behandlung der Tiere

Die tägliche intraperitoneale Miglustat-Injektion (Zavesca®, Acetelion Pharmaceuticals CAS Nr.: 72599-27-0, 300 mg/kg Körpergewicht gelöst in 0,9 % Kochsalzlösung) der Gruppen Kombi und Miglu erfolgte von P10-P22. Von P23 bis zur Präparation der Tiere wurde die Therapie peroral (1200 mg/kg Körpergewicht) fortgeführt, das Medikament wurde dafür in die Futterpellets eingearbeitet, um eine gleichmäßige Aufnahme zu gewährleisten. Die wöchentliche Allopregnanolon-Injektion (25 mg/kg Körpergewicht; CAS Nr.: 906-83-2, Sigma Aldrich) gelöst in 40 % Cyclodextrinlösung (4000 mg/kg; CAS Nr.: 128446-35-5, Sigma Aldrich gelöst in Ringerlösung) der Gruppe Kombi erfolgte von P7 bis zur Präparation der Tiere.

Die Gruppe Sham wurde nach demselben Zeitschema wie die Gruppe Kombi behandelt.

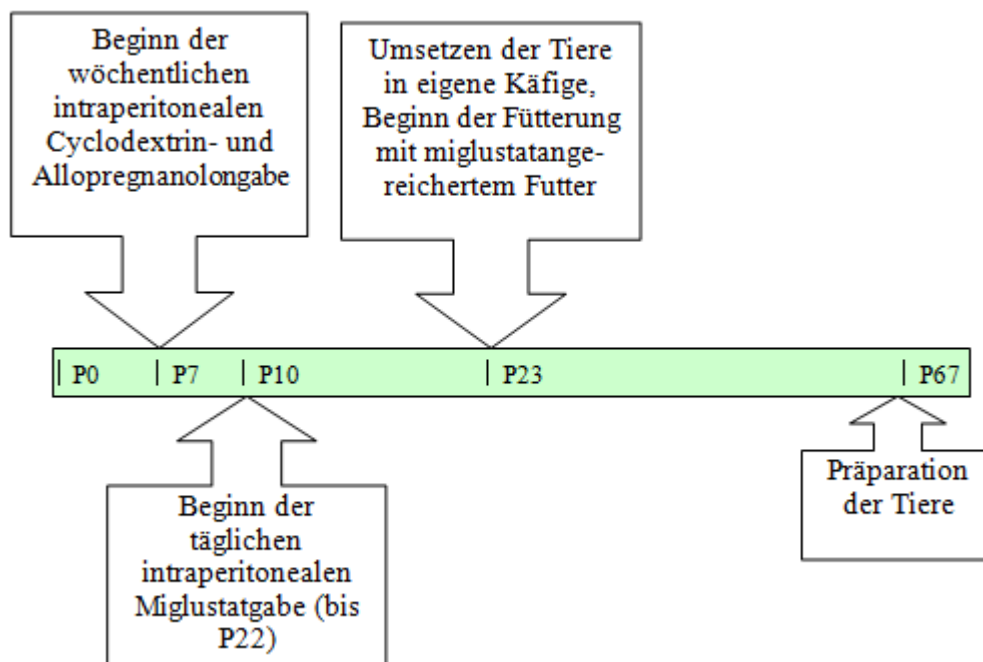


Abb.9 Behandlungsplane für die Gruppe Kombi

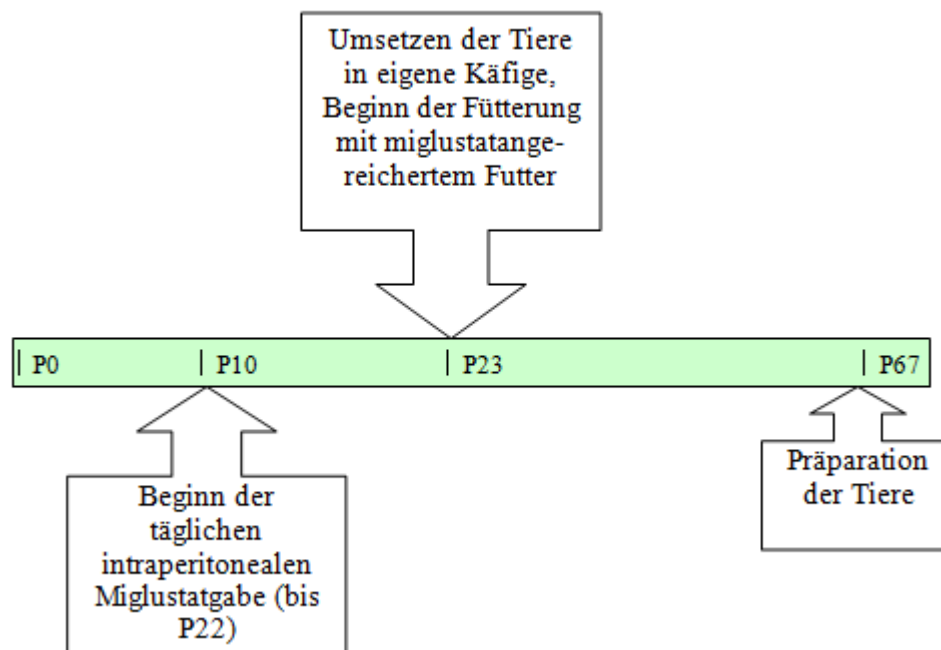


Abb.10 Behandlungsplan für die Gruppe Miglu

2.3 Gewichtsbestimmung, Blutentnahme und Präparation der Tiere

Das Gewicht wurde u.a. im Vorfeld jeder Injektion bestimmt, was es uns ermöglicht, Effekte der pharmakologischen Behandlung auf die Gewichtsentwicklung zu untersuchen. Die erste

2. Methoden 2.3 Gewichtsbestimmung, Blutentnahme und Präparation der Tiere

Wiegung erfolgte am vierten postnatalen Tag, ab dem siebten postnatalen Tag erfolgte eine tägliche Gewichtsbestimmung bis zum 19. postnatalen Tag. Anschließend wurde das Gewicht vor jeder Injektion mit Allopregnanolon und Cyclodextrin gemessen, auch bei den damit nichtbehandelten Gruppen. Dies erfolgte zum letzten Mal am 67. postnatalen Tag.

Des Weiteren wurden bei der Präparation und Probengewinnung noch einmal das Körpergewicht und das Hirngewicht bestimmt.

Zur Präparation wurden die Tiere zunächst mit Isofluran narkotisiert und gewogen. Bei suffizienter Narkose wurde den Tieren 0,1 ml Narkotikum (90 ml NaCl + 2,5 ml Xylazin + 7,5 ml Ketamin) pro 10 g Körpergewicht intraperitoneal verabreicht. Nachdem die Maus keine Reaktion mehr auf Schmerzreize zeigte, wurde der Bauchraum eröffnet und das Herz freigelegt. Mit einer Kanüle wurde aus der Vena cava inferior entnommen. Anschließend erfolgte die Perfusionsfixierung. Dazu wurde der rechte Vorhof eröffnet und anschließend eine Kanüle in den linken Ventrikel geschoben, über welche ca. 25-30 ml NaCl-Lösung gegen wurden, bis die Leber aufgrund der Blutleere hell wurde. Dann wurde die Perfusion mit PFA (Paraformaldehyd 3,7 %) fortgesetzt, wobei etwa 50 ml PFA mittels einer Rollpumpe gegeben wurden.

Zur Hirnentnahme wurde die Schädelkalotte der Maus entfernt und das Hirn vom Hirnstamm an mit der Knochenzange freigelegt. Nach Abzug der Hirnhäute wurde das Gehirn mittels eines Spatels entnommen und gewogen und in ein Gefäß mit PFA zum Nachfixieren gegeben.

2.4 Elevated Plus Maze

Zur Evaluation von Angst oder Angstinduktion eignet sich besonders das Elevated Plus Maze. Es hat die Form eines Kreuzes mit gleichlangen Armen, zwei davon sind mit Wänden umgeben (L/B/H 300 mm x 45 mm x 150 mm), die anderen beiden Arme sind offen (L/B/H 300 mm x 45 mm x 5 mm). Die vier Arme gehen von einer zentralen Plattform (50 x 50 mm) aus. Das gesamte Testgebiet befindet sich 76,5 cm über dem Boden. Getestet wurde in abgedunkelter Umgebung bei 3,5 Lux. Die Tests starteten immer eine Stunde nach Beginn der Aktivitätsphase der Mäuse und nach einer Gewöhnungszeit von zehn Minuten an den Testraum. Zur Durchführung des Tests wurde die Maus auf die Plattform in der Mitte des Kreuzes gesetzt, mit dem Kopf in Richtung eines geschlossenen Armes und durfte das Gebiet dann für zehn Minuten erkunden. Ein Arm galt als besucht, wenn sich alle vier Gliedmaßen der Maus auf einem Arm befanden. Die Mäuse wurden dabei von einer Videokamera aufgezeichnet und der Durchlauf mit der Software VideoMot 2 (TSE Systems) ausgewertet.

2. Methoden 2.3 Gewichtsbestimmung, Blutentnahme und Präparation der Tiere

Nach jedem Durchgang wurde die Apparatur mit dem Desinfektionsmittel Sterillium® von Bode gereinigt, um Verhaltensbeeinflussung durch Geruchsstoffe zu verhindern.

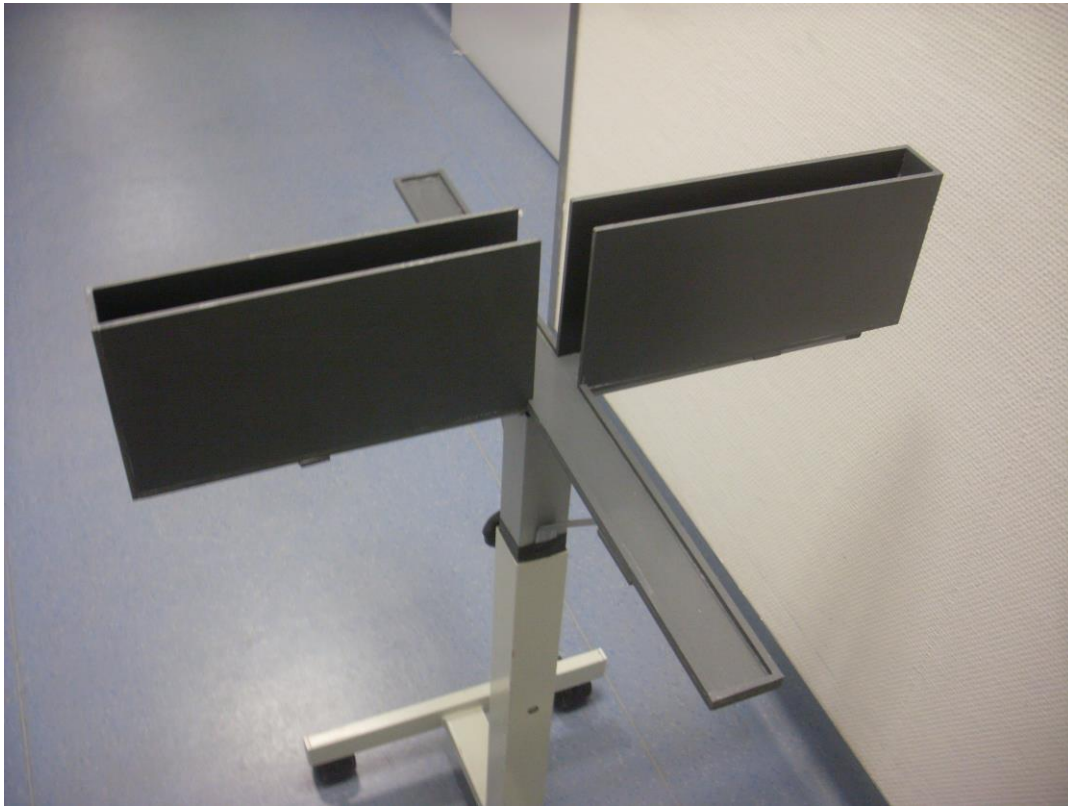


Abb.11 Elevated Plus Maze

Dieser Test verursacht bei Nagetieren einen Annäherungs-Vermeidungskonflikt (Cruz et al. 1994, Pellow und File 1986).

Die offenen und geschlossenen Arme erzeugen als neue Umgebung ein Erkundungsverhalten, wobei das Vermeiden der offenen Arme ein Indikator für die Angstintensität ist (Hogg 1996, Lister 1987). Dieses Model wurde pharmakologisch validiert (Handley et Mithani 1984), angstlösende Pharmaka erhöhten die Besuchszahl in offenen Armen, während angstfördernde Pharmaka die Besuchszahl erniedrigten. Diese Ergebnisse wurden bestätigt und erweitert (File 1987, Pellow et al. 1985, Rodgers und Cole 1993). Das EPM ähnelt dabei dem Open Field, das einen ähnlichen Konflikt auslöst (Montgomery 1958).

Neben der Emotionalität der Tiere beeinflussen auch Thigmotaxis (Treit und Fundytus 1988), die Orientierung anhand von Tastreizen, sowie Höhenangst das Verhalten.

Ein Maß für das Angstempfinden ist die relative Zeit, die die Maus im Bereich der offenen Arme verbringt und in dem prozentualen Anteil an Besuchen der offenen Arme (Hogg 1996, Pellow et al. 1985, Pellow und File 1986). Diese Parameter korrelieren invers mit dem Angstempfinden, je ängstlicher die Maus, desto weniger Zeit verbringt sie in den offenen

2. Methoden 2.3 Gewichtsbestimmung, Blutentnahme und Präparation der Tiere

Armen. Die Gesamtanzahl an Armbesuchen reflektiert die motorische Aktivität. Auch die Anzahl der Besuche der geschlossenen Arme sowie das Aufrichten an den Wänden der geschlossenen Arme spiegelt motorische Aktivität wieder (File 1986).

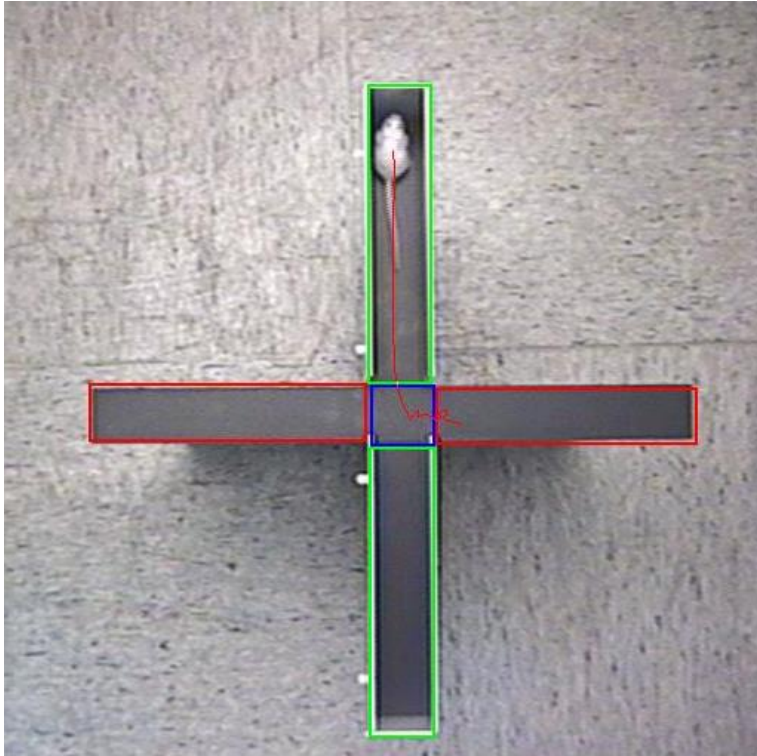


Abb.12 Beispielhafte Darstellung des Testgebiets mit Maus im Trackingprogramm (Bioprobeshk URL: http://www.bioprobeshk.com/catalog/products.php?cPath=21_102&pid=242 zuletzt aufgerufen am 14.10.2016) ©2006 Bioprobes Ltd.

2.5 Open Field

Der Open Field Test ist ein Spontanmotoriktest, der auch zur Detektion von ängstlichem Verhalten eingesetzt werden kann. Dazu wird eine Maus in der Mitte eines Vierecks oder Kreises (Badhishtov et al. 1995) bei standardisierter Raumbeleuchtung von 100 Lux (Crawley 1985) platziert. Wir verwendeten eine quadratische Arena, 50 cm x 50 cm in der Fläche, mit 40 cm hohen, undurchsichtigen Wänden. Die Arena befindet sich in einer Isolationsbox in dessen Decke eine Lichtquelle mit einer Helligkeit von 100 Lux sowie eine Kamera eingebaut ist. Die Helligkeit wurde mit einem Light Meter der Firma TES - Electrical Electronic Corp., Modell TES 1335 Light Meter, bestimmt. Jeder Durchlauf wurde am Computer mit VideoMot 2 (TSE Systems) ausgewertet, das Testgebiet wird dazu virtuell in 16 Quadrate eingeteilt. Die vier mittleren Quadrate bilden den zentralen und die zwölf äußeren den peripheren Bereich.

2. Methoden 2.3 Gewichtsbestimmung, Blutentnahme und Präparation der Tiere

Wie schon bei Elevated Plus Maze wurden die Mäuse immer eine Stunde nach Beginn der Aktivitätsphase getestet. Nach zehn minütiger Gewöhnungszeit an den Testraum wurde immer eine Maus in die Mitte der Arena gesetzt und die Isolationsboxtüren verschlossen. Anschließend wurde die Maus 15 min gefilmt. Dabei wurden horizontale Aktivität und Gesamtdistanz (Anzahl aller Eintritte in den zentralen und peripheren Bereich) und die zurückgelegte Distanz gemessen.

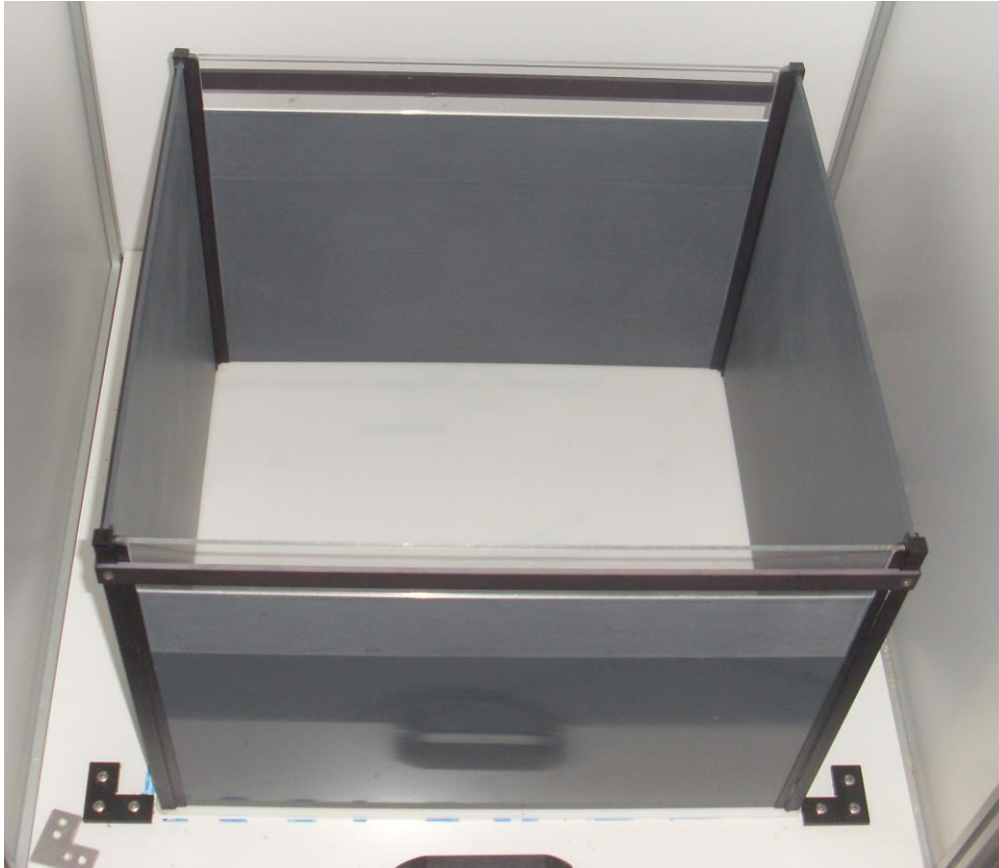


Abb.13 Open Field, Arena aus grauem Acrylkunststoff in der Isolationsbox

Auch hier entsteht für die Maus der Konflikt zwischen dem Erforschen eines neuen Gebiets und der Vermeidung lichter, weiter Bereiche (Defries et al. 1966), wobei Thigmotaxis ebenfalls eine Rolle spielt (Treit und Fundytus 1988). Die Neugierde, die emotionale Reaktivität, oder beides können eine Maus motivieren eine neue Umgebung zu erforschen. Der stimulierende Effekt von emotionaler Erregtheit auf die zurückgelegte Distanz wurde in einer Studie von Eikelis und van den Buuse 2000 bestätigt, wenngleich Denenberg (1969) einen gegenläufigen Zusammenhang zwischen motorischer Aktivität und emotionaler Erregung diskutierte. Licht, Geräusche und auch Gerüche beeinflussen dabei die motorische Aktivität und Emotionalität der Tiere (Walsh und Cummins 1976). Daher wurde immer eine Beleuchtung von 100 Lux verwendet, der Geräuschpegel soweit möglich geringgehalten und

2. Methoden 2.3 Gewichtsbestimmung, Blutentnahme und Präparation der Tiere

das Open Field nach jedem Durchgang mit Sterillium® gereinigt. Andere Einflüsse auf das Verhalten der Mäuse sind die Trennung von Käfiggenossen während des Tests (File 1980, Prut und Belzung 2003), genetische Unterschiede, experimenteller Hintergrund, Biorhythmus, Wurfgröße und Geschlecht der getesteten Tiere. Weiterhin beeinflussen Behandlungen vor und nach dem Stillen und die Beobachtungsmethode das Verhalten der Mäuse (Walsh und Cummins 1976).

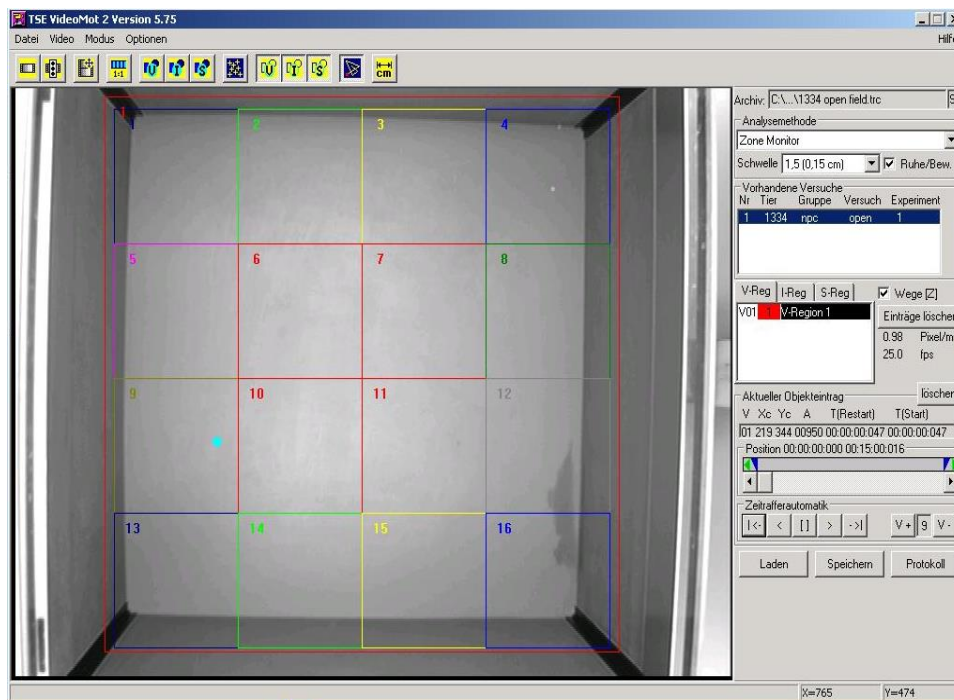


Abb.14 Ansicht des Testgebiets über die TSE VideoMot 2, Quadrant sechs, sieben, zehn und elf bilden den zentralen Bereich

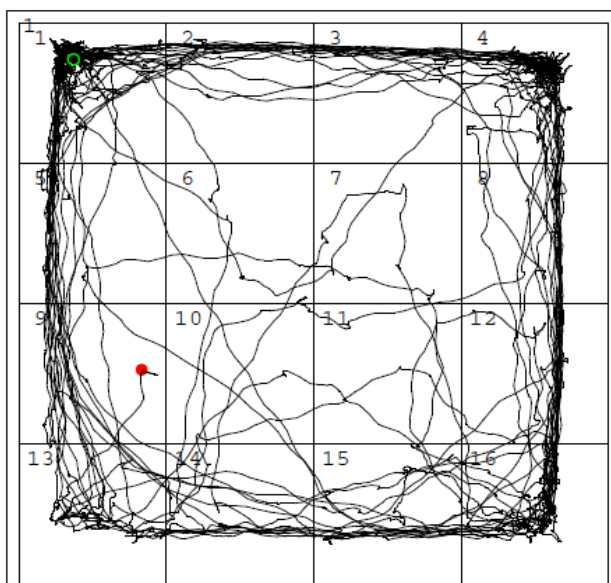


Abb.15 Ergebnis eines 15-minütigen Testdurchlaufs (TSE VideoMot 2 Video Activity Measuring System Black & White System Operating Instructions)

2.6 Hot Plate

Der Hitzeplattetest ist einer der meist genutzten Test zum Nachweis der Wirksamkeit analgetischer Pharmaka (Pick et al. 1991) und neuropathischer Nervenschäden. Die Tests fanden wie immer eine Stunde nach Beginn der Aktivitätsphase der Mäuse statt.

Nach einer Eingewöhnungszeit von 10 min an den Testraum begannen die Versuche. Die Maus wurde hierbei auf eine heiße Platte der Firma Medax mit 52,5 °C gesetzt (van Gaalen und Steckler 2000). Ein durchsichtiger Kunststoffbecher ohne Boden ermöglicht dabei, die genaue Beobachtung der Maus. Gemessen wurde die Zeit bis die Maus springt, unruhig wird oder die Pfoten anhebt und/oder sich diese leckt (Rubinstein et al. 1969, Wiesenfeld-Hallin et al. 1990). Wenn die Maus nicht innerhalb von 15 s reagierte, wurde sie von der Platte genommen um Schäden zu vermeiden.

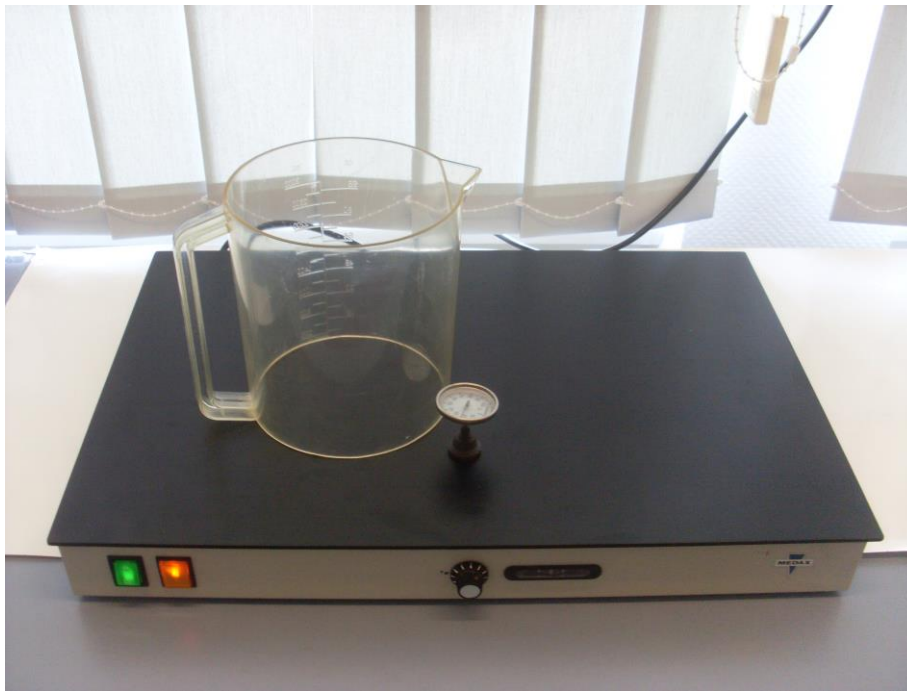


Abb.16 Hot Plate mit Thermometer und Kunststoffbecher ohne Boden

2. Methoden 2.3 Gewichtsbestimmung, Blutentnahme und Präparation der Tiere

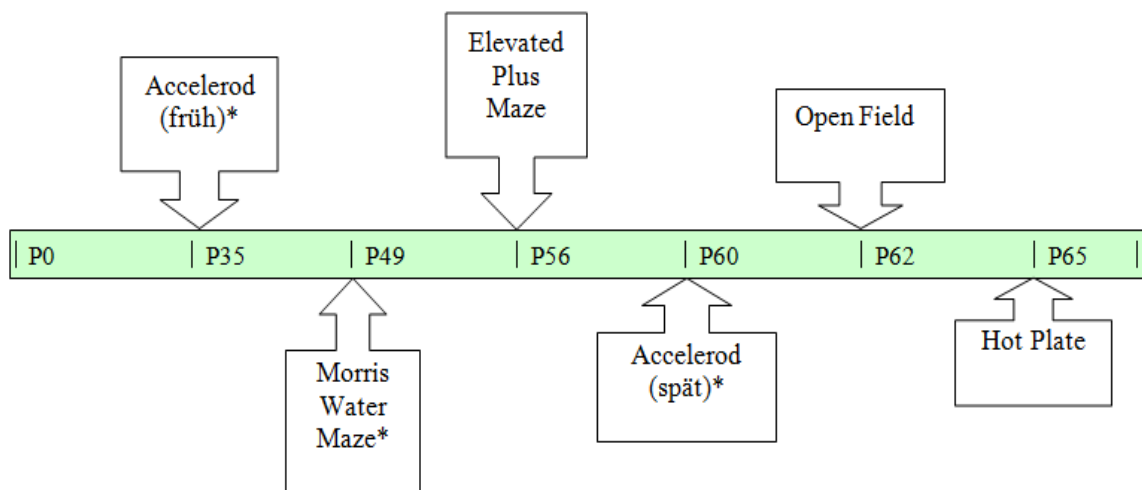


Abb.17 Ablaufplan der Experimente, die mit * markierten Versuche werden in der Arbeit von Victoria Schlegel behandelt.

2.7 Accelerod Test/ Rota Rod

Neben den in dieser Arbeit ausgewerteten Versuchen durchliefen die Tiere noch weitere Tests, wie der Ablaufplan in Abbildung 17 zeigt. Die Ergebnisse dieser Test und weitere Informationen sind in der Dissertation von Victoria Schlegel zu finden.

Beim Accelerod-Test handelt es sich um einen Motoriktest für Nagetiere. Zuerst beschrieben und entwickelt wurde dieser Test von Jones und Roberts 1968. Der Versuchsaufbau besteht aus einer motorbetriebenen Walze mit rutschfester Oberfläche mit einem Durchmesser von 30 mm und einer Länge von 500 mm von TSE Systems, Modell Rota Rod. Fünf Trennwände unterteilen die Walze in vier Abschnitte. 25 cm unterhalb der Walze befindet sich ein Auffanggitter, welches eine Berührungssensorik besitzt. Sobald eine Maus von der Walze fällt, wird diese ausgelöst und z.B. die Zeit gestoppt. Die Tests fanden standardisiert bei 10 Lux Raumbeleuchtung während der Aktivitätsphase der Tiere und nach einer zehnminütigen Eingewöhnungszeit im Versuchsraum statt.

Die Fähigkeit der Maus auf der sich bewegenden Walze zu balancieren gibt Rückschlüsse auf die Koordination und Geschicklichkeit der Tiere (Barlow et al. 1996).

Es existieren zwei Möglichkeiten der Testung. Beim sogenannten Rota Rod-Test rotiert die Walze mit gleichbleibender Geschwindigkeit. Die Versuchstiere werden auf die Walze gesetzt und es wird die Zeit gemessen, bis sie von der Walze fallen. Nach 60 s wird die Messung beendet, sollten die Tiere noch nicht gefallen sein.

2. Methoden 2.3 Gewichtsbestimmung, Blutentnahme und Präparation der Tiere

Die zweite und sensitivere Methode stellt der Accelerod-Test dar (Karl et al. 2003). Bei diesem Test nimmt die Rotationsgeschwindigkeit der Walze kontinuierlich zu. Auch hier wird die Zeit gemessen, bis die Tiere von der Walze fallen. Um den Einfluss des Lernens und der Motivation zu minimieren, müssen die Tiere vorher suffizient trainiert werden.

Um die Tiere zu trainieren, wurden eine Rotationsgeschwindigkeit von 12 U/min und ein Zeitraum von 120 s gewählt. Gemessen wurde die Zeit bis zum ersten Herunterfallen und wie oft die Tiere während des Trainings von der Walze fielen. Einmal heruntergefallene Tiere wurden wieder auf die Walze gesetzt, bis die Versuchszeit vorüber war. Das Training erfolgte so lange, bis kein Lerneffekt mehr messbar war.

Der eigentliche Test (Accelerod) wurde insgesamt sechs Mal durchgeführt. Dabei steigerte sich die Umdrehungsgeschwindigkeit der Walze von anfangs 4 U/min in regelmäßigen Abständen auf letztendlich 40 U/min innerhalb von 5 min Testzeit. Mit dem Computerprogramm TSE Rota Rod V2.6 erfolgte die Aufzeichnung der Rotationsgeschwindigkeit, sowie die Zeit bis die Maus von der Walze fiel. Im Gegensatz zum Training wurden die Tiere nicht wieder auf die Walze gesetzt, wenn sie einmal gefallen waren. Dieser Test wurde zu zwei Zeitpunkten durchgeführt. Erstmalig an P35 und letztmalig an P60.



Abb.18 Versuchsaufbau Accelerod/Rota Rod (Foto zur Verfügung gestellt mit freundlicher Unterstützung von Jana Petersen)

2.8 Morris Water Maze

Beim Morris Water Maze handelt es sich um einen Motorik- und Gedächtnistest für Nagetiere. Die Tiere lernen orientierend an der Umgebung eine unter der Wasseroberfläche verborgene Plattform wiederzufinden (Morris, 1984; Hodges, 1995; Karl et al., 2003).

Der Versuchsaufbau besteht aus einem Becken mit einem Durchmesser von 107 cm und 50 cm hohen Wänden, welches mit 19 °C temperiertem Wasser 20 cm hoch gefüllt wird. Zur besseren Orientierung der Tiere wurden an den Wänden große Symbole in Sichthöhe angebracht. Der Test fand in einem abgedunkelten Raum bei ca. 3,5 Lux Beleuchtung statt. Das Becken wurde in vier Quadranten aufgeteilt und in einem dieser Quadranten wurde eine Plattform mit einer Höhe von 18,5 cm und einem Durchmesser von 11 cm unter der Wasseroberfläche positioniert. Die Messung erfolgte wie bei Elevated Plus Maze und Open Field mit dem Trackingprogramm VideoMot 2 (TSE Systems).

Zur Gewöhnung wurden die Tiere am ersten Tag kurz zum Schwimmen ins Wasser gelassen. Ab dem zweiten Tag erfolgte das Training der Tiere. Dazu wurden die Tiere in einen der Quadranten ohne Plattform gesetzt und hatten 60 s Zeit die Plattform zu finden. Wurde die Plattform nicht innerhalb der 60 s gefunden, wurden die Tiere zur Plattform geleitet und durften dort 10 s verweilen. Es erfolgten zwei Trainingsblöcke zu je vier Versuchen, welche nur durch das Herausnehmen und Abtrocknen der Mäuse unterbrochen wurden. Am dritten Tag wurden wieder zwei Trainingsblöcke mit jeweils vier Versuchen pro Tier durchgeführt. Am vierten Tag erfolgte ein weiterer Trainingsblock gefolgt vom eigentlichen Testlauf. Die Plattform wurde hierfür entfernt und die Tiere wurden diagonal zur ehemaligen Plattformposition ins Wasser gesetzt. Es wurde für 60 s das Verhalten der Tiere aufgezeichnet, insbesondere das Aufsuchen der ehemaligen Plattformposition.



Abb.19 Versuchstier, das die versteckte Plattform im wassergefüllten Becken gefunden hat. (Physiological Research, URL: <http://physiologicalresearch.weebly.com/water-maze-test.html>, zuletzt aufgerufen am 14.10.16)

2.9 Statistik und Diagramme

Die statistische Auswertung der Gewichtsentwicklung, der Verhaltenstests, sowie des Schmerztests erfolgte mit Sigma Plot 11.0 (Systat Software GmbH). Die Auswertung der Gewichtsentwicklung erfolgte mittels einer zweifaktorielle Varianzanalyse (Two Way Anova) für Gaußverteilungen. Zwischen welchen Wertpaaren signifikante Unterschiede bestanden, wurde anschließend mit dem Post-Hoc Test nach Holm-Sidak geprüft.

Für das Hirn- und Körpergewicht an P67 sowie die Verhaltenstests wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (One Way Anova) für normal verteilte Daten genutzt. Anschließend erfolgte ein Gruppenvergleich mittel des Holm-Sidak Tests. Für nicht normal verteilte Daten wurde der Kruskal-Wallis-Test genutzt und anschließend mittel Dunns-Test ein Gruppenvergleich vorgenommen.

Der Hitzeplattentest wurde ebenfalls mit dem Kruskal-Wallis-Test ausgewertet. Zwischen welchen Wertpaaren signifikante Unterschiede bestanden, wurde mit Dunns-Test geprüft.

Das Signifikanzintervall wurde für alle Analysen mit $p < 0,05$ festgelegt, die Darstellung des Signifikanzniveaus erfolgt mit * für $p < 0,05$, ** für $p < 0,01$ und *** für $p < 0,001$.

Die Erstellung der Diagramme erfolgte unter der Verwendung von Excel Version 2010 (Microsoft). Für normalverteilte Daten wurden der Mittelwert und die Standardabweichung verwendet und diese in Säulendiagrammen dargestellt. Für die nicht normalverteilten Daten wurden der Median, sowie der Interquartilenabstand zwischen dem 25. und 75. Quartil verwendet und diese wurden in Box Plot-Diagrammen dargestellt. Die Fehlerbalken stellen hierbei die obere und untere Grenze dar, bis zu welcher Werte innerhalb des 10. oder 90. Perzentils liegen. Alle Werte darunter oder darüber werden als Ausreißer bezeichnet und sind in den Diagrammen als Rauten dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1 Gewichtsentwicklung der Tiere

Um einen Einfluss der medikamentösen Therapie auf die Gewichtsentwicklung zu untersuchen, wurden die Tiere zu festgelegten Zeitpunkten gewogen. Hintergrund sind die häufigen gastrointestinalen Nebenwirkungen von Miglustat, die letztendlich zu einem Gewichtsverlust führen können (Fachinformation Zavesca®). Am Tag der Tötung wurde nochmals das Körper-, sowie das Hirngewicht bestimmt, um einen möglichen Effekt auf das Hirngewicht durch die medikamentöse Behandlung untersuchen zu können.

Ein Unterschied in der Gewichtsentwicklung in den drei Gruppen zeigte sich schon frühzeitig und ab P10 signifikant ($p < 0,001$). Die Gewichtsentwicklung der Gruppe Kombi verlief verzögert ab P10 und dann eher parallel zu den Gruppen Sham und Miglu. Zum Ende des Experiments waren die Tiere der Gruppe Kombi ca. 2 g leichter als die Tiere der anderen Gruppen (Abbildung 20).

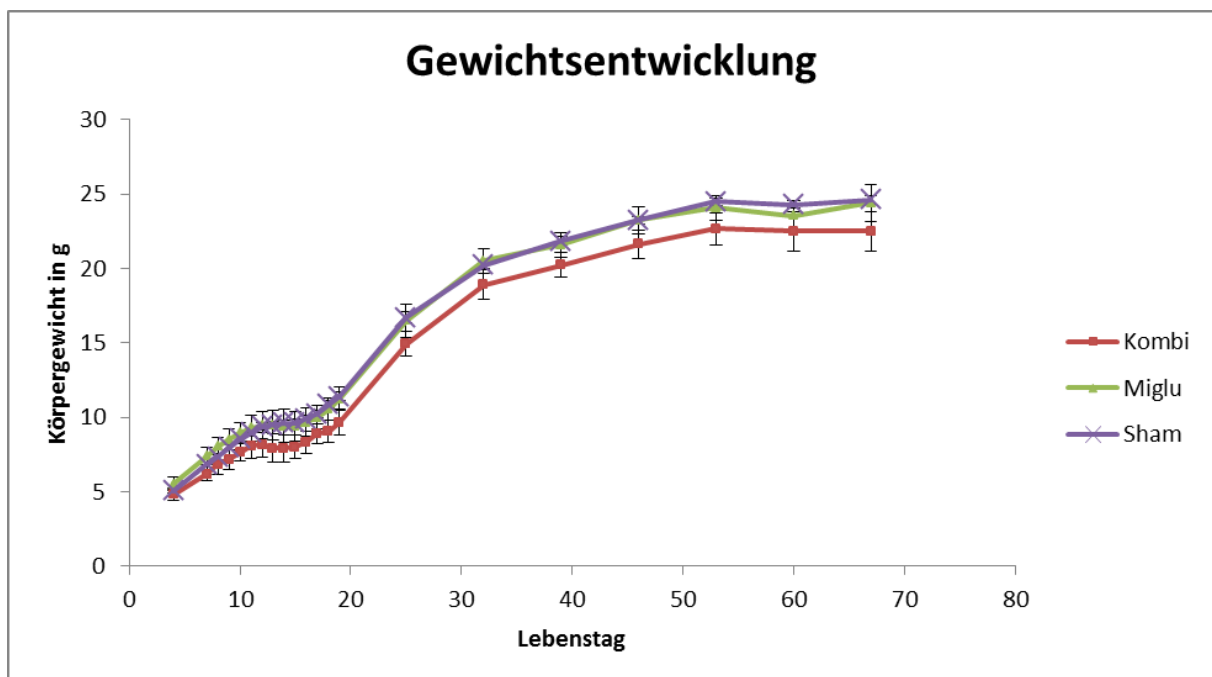


Abb.20 Gewichtsentwicklung der einzelnen Gruppen, dargestellt sind die MW und Stabw im zeitlichen Verlauf. Die Tiere der Gruppe Kombi weisen ein geringeres Körpergewicht auf. Das geringere Körpergewicht bleibt über den gesamten Entwicklungszeitraum bestehen. Das Signifikanzniveau kann ab P10 mit *** angegeben werden, ausgenommen P60 mit **. Auf die Darstellung im Diagramm wurde der Übersichtlichkeit halber verzichtet.

Zum Zeitpunkt der Tötung zeigte sich ein signifikanter Unterschied der Gruppen Sham ($24,6 \text{ g} \pm 1,5 \text{ g}$) und Miglu ($24,4 \text{ g} \pm 1,3 \text{ g}$) zur Gruppe Kombi ($22,5 \text{ g} \pm 1,6 \text{ g}$) ($p < 0,001$). Die Gruppen Sham und Miglu unterschieden sich nicht ($p = 0,610$) (Abbildung 21).

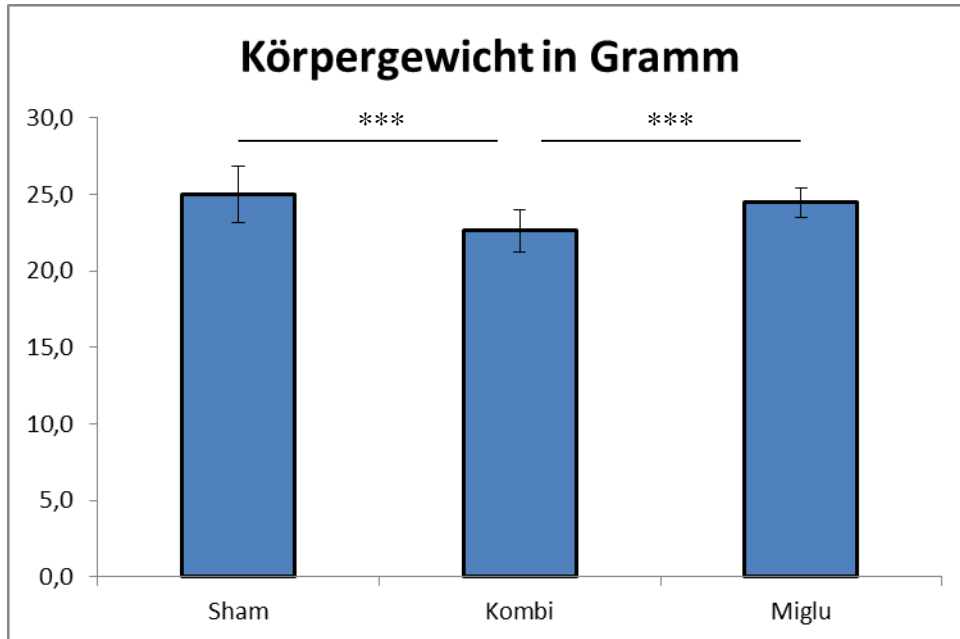


Abb.21 Die Tiere der Gruppe Kombi sind im Mittel ca. 2 g leichter, der Unterschied ist signifikant.

Beim Hirngewicht zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Tieren der Gruppe Sham ($0,449 \text{ g} \pm 0,028 \text{ g}$) und Kombi ($0,408 \text{ g} \pm 0,023 \text{ g}$), sowie zwischen der Gruppe Sham und Miglu ($0,426 \text{ g} \pm 0,016 \text{ g}$) ($p < 0,001$). Kombi und Miglu unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Die leichtesten Gehirne weist die Gruppe Kombi auf (Abbildung 22).

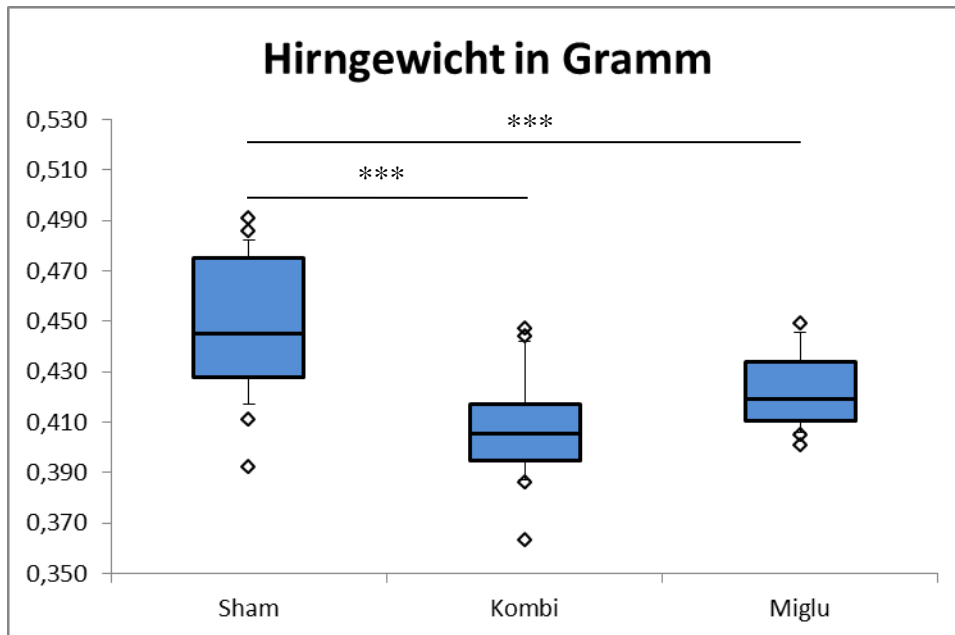


Abb.22 Hirngewichte zum Zeitpunkt der Tötung. Die Gehirne der Kombitiere sind 40 mg, die der Miglutierte ca. 20 mg leichter als die Gehirne der scheinbehandelten Tiere. Rauten stellen Ausreißer dar, welche unter- oder oberhalb der 10. bzw. 90. Perzentile liegen.

Zusammengefasst lässt sich ein Effekt auf die Gewichtsentwicklung durch die Kombinationstherapie erkennen, der die Tiere der Gruppe Kombi zum Zeitpunkt der Tötung zu den leichtesten Tieren macht. Außerdem ist ein deutlicher Effekt auf die Hirnmasse bei den behandelten Tieren zu erkennen.

3.2 Elevated Plus Maze

Der Elevated Plus Maze Test wurde angewendet, um einen möglichen Effekt der Kombinationstherapie oder des Miglustats auf das Angst- und Erkundungsverhalten der Tiere zu untersuchen.

Im selben Test wurde außerdem die motorische Aktivität der Tiere anhand der Gesamtbesuchszahl, sowie der Globalgeschwindigkeit beurteilt. An P56 fand dieser Test einmalig statt.

3.2.1 Erkundungsverhalten/Emotionalität

Zur Erfassung des Erkundungsverhaltens bzw. der Emotionalität der Tiere wurden die Parameter relative Versuchszeit im offenen Bereich, relative Besuche der offenen Arme und die dort zurückgelegte Strecke bezogen auf die Gesamtstrecke ausgewertet.

Die Auswertung der Daten wurden mittels einer einfaktoriellen Kruskal-Wallis-Varianzanalyse und dem Posthoc-Test nach Dunn durchgeführt.

Die Tiere der Gruppe Sham verbrachten mit 14,0 % (IQR 1,3 – 22,5 %) signifikant mehr Versuchszeit im Bereich der offenen Arme, als die Tiere der Gruppe Kombi mit 2,6 % (IQR 0,2 – 6,0 %) und die Tiere der Gruppe Miglu mit 2,3 % (IQR 0 – 4,2 %) ($p=0,003$) (Abbildung 23).

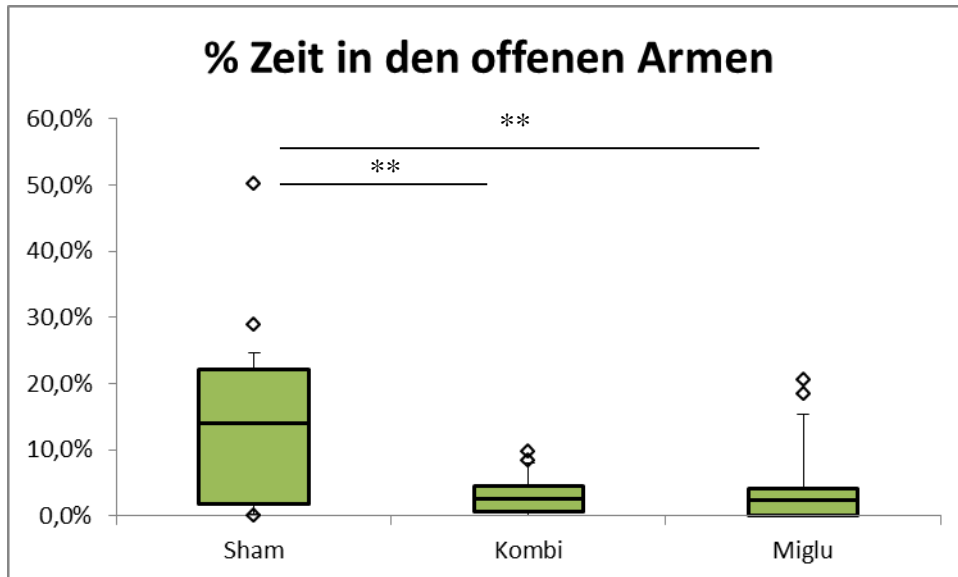


Abb.23 Die Tiere der Gruppe Sham verbrachten signifikant mehr Zeit im offenen Bereich.

Die Tiere der Gruppe Sham legten im Bereich der offenen Arme mit 31,2 % (IQR 3,7 – 51,4 %) der Gesamtstrecke signifikant mehr Weg zurück, als die Tiere der Gruppen Kombi (7,2 %, IQR 1,8 – 14,9 %) und Miglu (8,1 %, IQR 0 – 12,7 %) ($p=0,005$) (Abbildung 24).

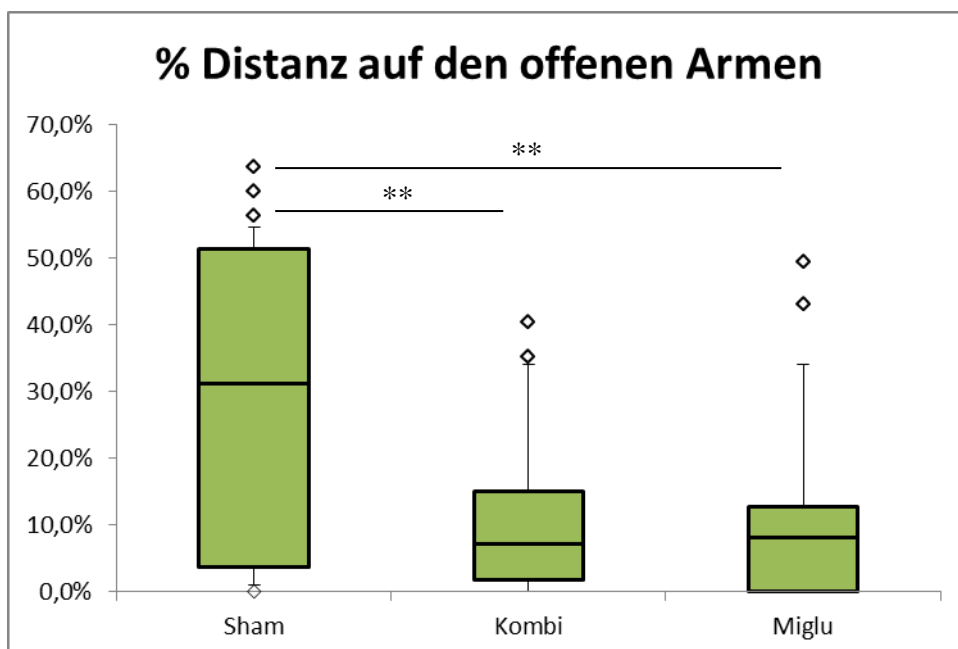


Abb.24 Die scheindehandelnden Tiere der Gruppe Sham legten mehr Strecke im Bereich der offenen Arme zurück als die behandelten Tiere.

Bei den Besuchen der offenen Arme zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied ($p=0,007$). Die Tiere der Gruppe Sham besuchten diese mit 17,6 % (IQR 7,8 – 31,1 %) öfter, als die Tiere der behandelten Gruppen (Kombi 8,0 %, IQR 1,6 – 12,8 % und Miglu 7,6 %, IQR 0 – 13,6 %) (Abbildung 25).

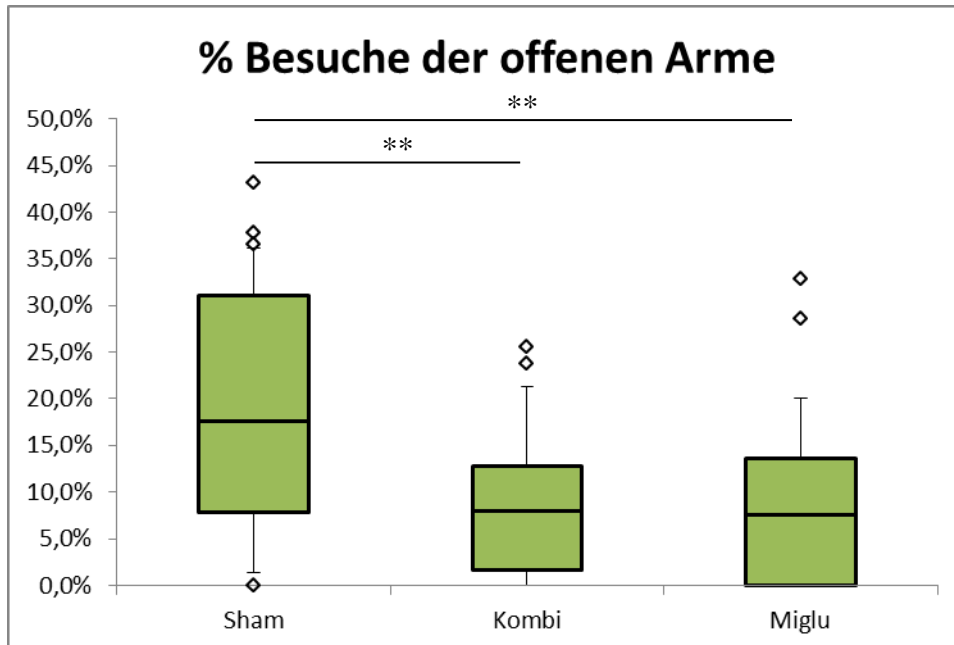


Abb.25 Die Tiere der Gruppe Sham besuchten den offenen Bereich signifikant öfter als die behandelten Tiere.

In Zusammenschau ergeben die Daten eine Beeinträchtigung des Erkundungsverhaltens bei den behandelten Tieren der Gruppe Kombi und Miglu und deuten auf eine erhöhte Ängstlichkeit hin.

3.2.2 Motorische Aktivität

Die motorische Aktivität wurde anhand der Gesamtbesuchszahl (offener + geschlossener Bereich und Zentrum), sowie der Globalgeschwindigkeit beurteilt.

Die Analyse der Daten erfolgte mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse, als Posthoc-Test wurde der Test nach Holm-Sidak verwendet. Für den Parameter „Gesamtbesuchszahl“ ergab sich ein signifikanter Unterschied ($p=0,001$). Die Tiere der Gruppe Sham zeigten eine höhere motorische Aktivität, was wir anhand einer Gesamtbesuchszahl von 54,0 Besuchen (IQR 45,0 – 60,0 Besuche) erkennen können. Die Tiere der Gruppe Kombi zeigten mit einer Gesamtbesuchszahl von 40,0 Besuchen (IQR 31,0 – 48,25 Besuche), sowie die Tiere der Gruppe Miglu mit einer Gesamtbesuchszahl von 41,5 Besuchen (IQR 27,25 – 48,0 Besuche) eine geringere motorische Aktivität (Abbildung 26).

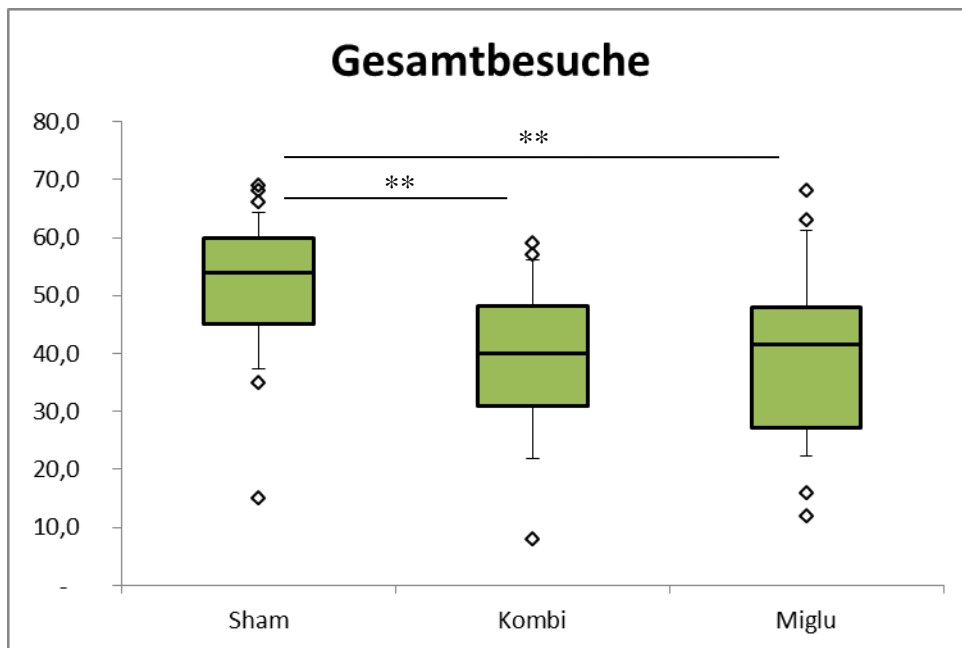


Abb.26 Die scheinbehandelten Tiere wechselten öfter zwischen den Bereichen.

Beim Parameter „Globalgeschwindigkeit“ konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden ($p=0,101$) (Sham $1,5 \pm 0,6$ m/s, Kombi $1,1 \pm 0,5$ m/s, Miglu $1,2 \pm 0,6$ m/s) (Abbildung 27).

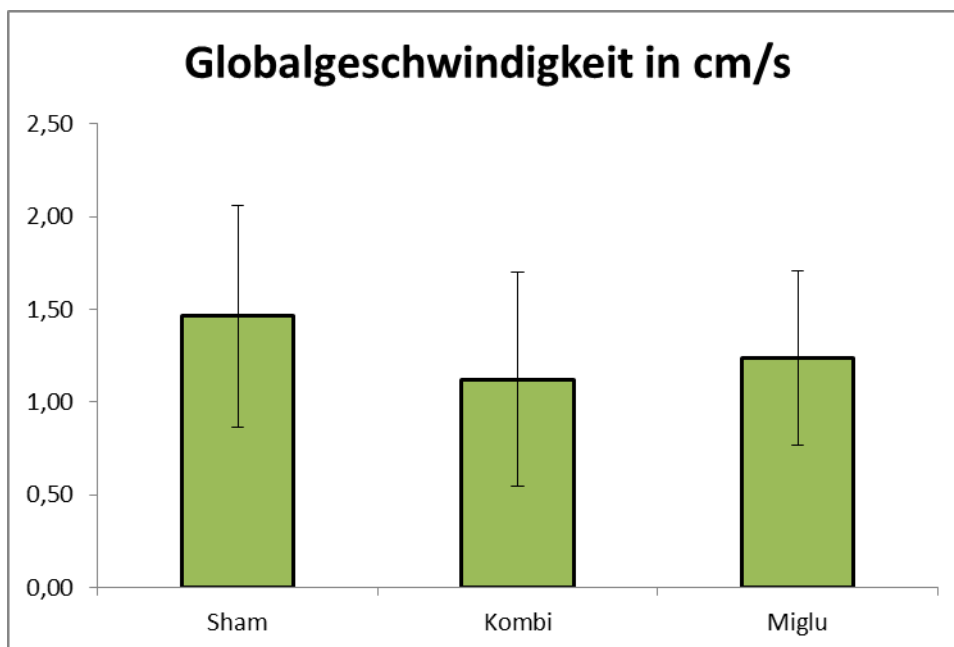


Abb.27 Es besteht kein signifikanter Unterschied in der Bewegungsgeschwindigkeit zwischen den Gruppen.

Die Ergebnisse der Parameter für die Erfassung der motorischen Aktivität zeigen eine höhere Rate an Bereichswechseln der scheinbehandelten Tiere gegenüber den behandelten Tieren. Es besteht kein Unterschied in der Bewegungsgeschwindigkeit.

3.3 Open Field

Das Open Field wurde verwendet, um einen möglichen Effekt der medikamentösen Behandlung auf die Spontanmotorik und das Erkundungsverhalten der Tiere zu untersuchen. Dieser Test wurde einmalig an P62 durchgeführt.

3.3.1 Erkundungsverhalten/Emotionalität

Zur Erfassung von Verhaltensveränderungen wurden die Parameter „Anteil der Zentrumsbesuche an den Gesamtbesuchen“, sowie der „Anteil der Zentrumsstrecke“ betrachtet. Zur Auswertung der Daten wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse durchgeführt, welche bei einem signifikanten Unterschied um einen Posthoc-Test nach Holm-Sidak erweitert wurde. Für den Anteil an Zentrumsbesuchen ergab sich ein signifikanter Unterschied ($p=0,032$). Die anschließende Posthoc-Analyse zeigte aber keinen Unterschied zwischen den Gruppen (Sham 10,2 %, IQR 6,7 – 14,5 %; Kombi 8,1 %, IQR 6,4 – 14,6 %; Miglu 15,8 %, IQR 10,2 – 17,2 %) (Abbildung 28).

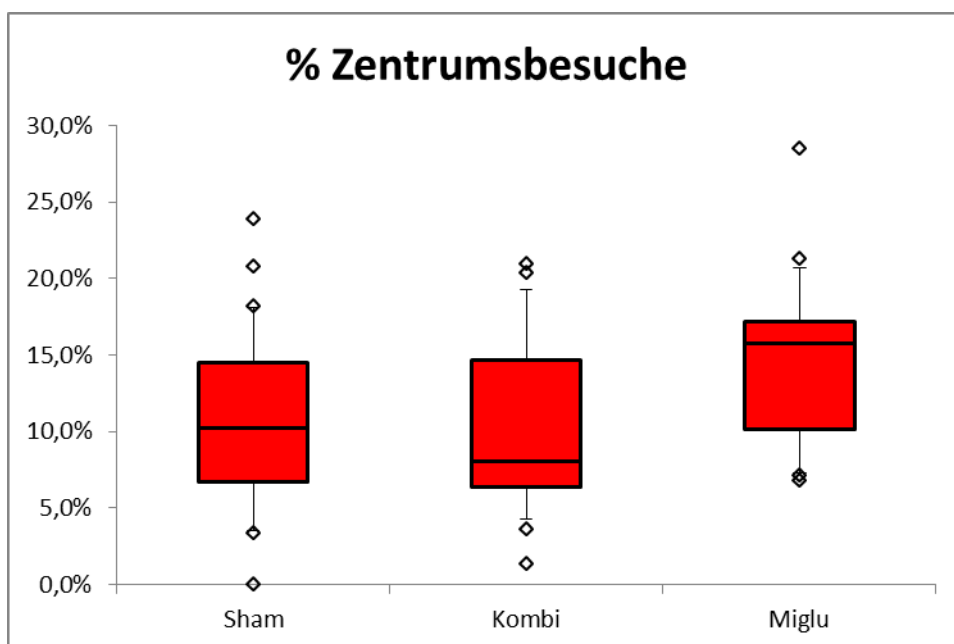


Abb.28 Es gibt keinen Unterschied zwischen den Gruppen beim Anteil an den Zentrumsbesuchen.

Beim Anteil der Zentrumsstrecke an der Gesamtstrecke konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p=0,057$) (Sham 8,2 %, IQR 5,5 – 10,2 %; Kombi 5,8 %, IQR 4,4 – 11,5 %; Miglu 12,0 %, IQR 7,9 – 14,5 %) (Abbildung 29).

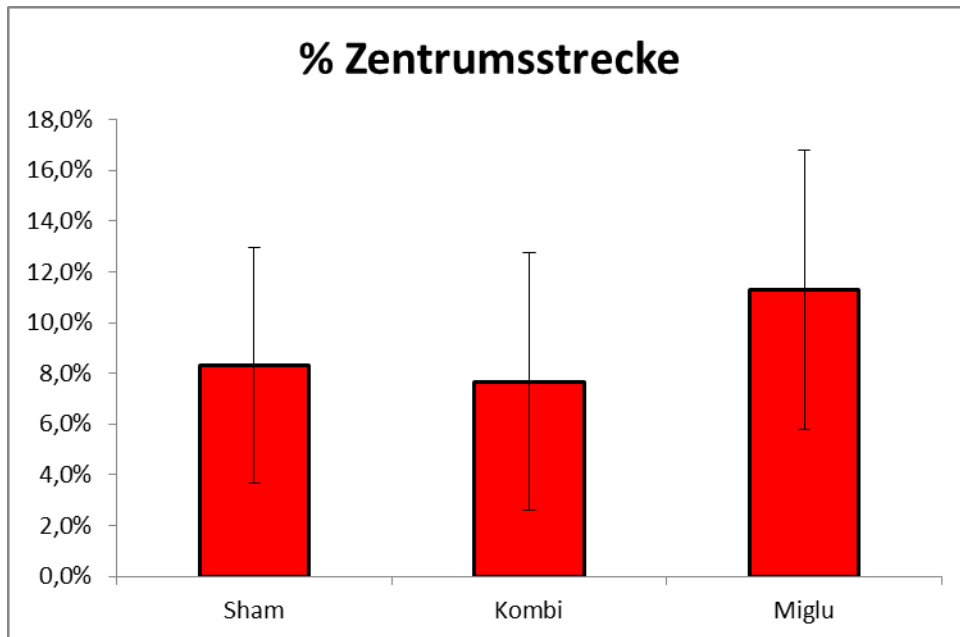


Abb.29 Es kann kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen im Parameter relative Zentrumsstrecke nachgewiesen werden.

Das Open Field erbrachte keinen Unterschied der Gruppen im Erkundungsverhalten.

3.3.2 Motorische Aktivität

Zur Beurteilung der spontanen motorischen Aktivität wurde der Parameter „Globalgeschwindigkeit“ herangezogen. Die Auswertung der Daten erfolgte unter Verwendung einer einfaktoriellen Kruskal-Wallis-Varianzanalyse, bei signifikanten Unterschieden erfolgte der Posthoc-Test nach Dunn. Für die Globalgeschwindigkeit konnte kein signifikanter Unterschied gezeigt werden ($p=0,061$) (Sham 5,03 m/s, IQR 4,63 – 5,33 m/s; Kombi 4,27 m/s, IQR 3,63 – 4,94 m/s; Miglu 5,27 m/s, IQR 4,3 – 6,2 m/s) (Abbildung 30).

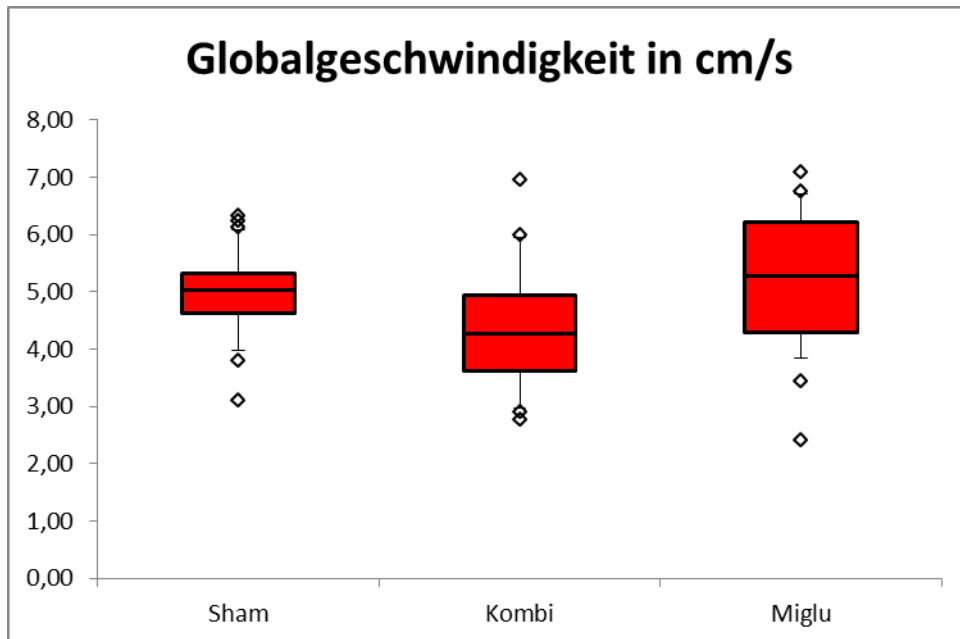


Abb.30 Es besteht kein signifikanter Unterschied im Bereich der Globalgeschwindigkeit.

Es zeigte sich kein Unterschied im Bereich der motorischen Aktivität.

3.4 Ergebnisse Hot Plate

Der Hot Plate Test wurde durchgeführt, um einen Einfluss der medikamentösen Therapie auf das Schmerzempfinden der Tiere zu ermitteln. Gemessen wurde die Zeit bis die Tiere eine als Schmerzreaktion zu deutende Reaktion, wie Pfoten lecken, Schwanz lecken oder Aufrichten, zeigten. Die Auswertung der Daten erfolgte mit einer einfaktoriellen Kruskal-Wallis-Varianzanalyse und dem Posthoc-Test nach Dunn. Es zeigten sich ein signifikanter Unterschied ($p=0,046$), zwischen den Tieren der Gruppe Kombi, welche nach 6,20 s (IQR 5,35 – 8,34 s) eine Reaktion zeigten und Miglu, welche erst nach 8,67 s (IQR 6,69 – 9,96 s) eine Reaktion zeigten (Abbildung 31).

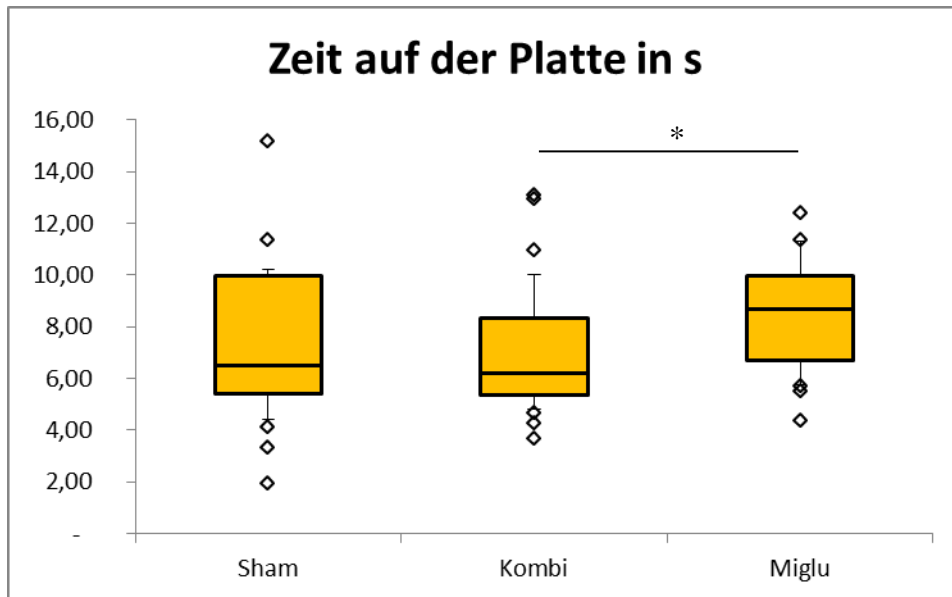


Abb.31 Zeit die verging, bis die Tiere eine Reaktion auf das Testgebiet zeigten. Es besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen Kombi und Miglu.

Die Daten des Hot Plate-Tests weisen auf eine mögliche Nervenschädigung der mit Miglustat allein behandelten Tiere hin.

4. Diskussion

4.1 Pharmakologische Behandlung

Morbus Niemann-Pick Typ C ist momentan eine unheilbare und nur unzureichend therapierbare neurodegenerative Erkrankung, die zu einer drastischen Verkürzung der Lebenserwartung führt. Beim Menschen ist lediglich Miglustat derzeit zur Behandlung des NPC zugelassen (Vanier 2010). Gleichzeitig handelt es sich um eine seltene Erkrankung (Patterson et al. 2001, Vanier 2010), was die Erforschung, unter anderem aufgrund der geringen Verfügbarkeit von Patienten und postmortalem Hirngewebes, erschwert. Dieser Umstand untermauert die Notwendigkeit von Tierversuchen.

Untersucht wurde in der vorliegenden Studie zum einen die reine Miglustatgabe, die beim Menschen ein Fortschreiten der Erkrankung zumeist verzögern kann (Vanier 2010), zum anderen aber auch die Kombination von Miglustat mit Cyclodextrin und Allopregnanolon. Diese Kombinationsbehandlung wurde schon erfolgreich im Tiermodell angewendet. Es zeigte sich eine drastische Verlängerung des Überlebens sowie eine Besserung der Symptomatik, was sich auf histologischer Ebene durch einen verzögerten Zellverlust, vor allem von Purkinjezellen, zeigt (Davidson et al. 2009). Die Kombinationsbehandlung vermag weiterhin krankheitsbedingte Veränderungen an der Cornea zu lindern (Hovakimyan et al. 2011).

Um nun die Auswirkungen der reinen Miglustattherapie und die der Kombinationstherapie auf Verhalten und Motorik und deren Nebenwirkungen zu untersuchen, behandelten wir Wildtypen der Mauslinie BALB/c Nctr-Npc1m1N/J mit beiden Möglichkeiten. Diesen wurde eine scheinbehandelte Kontrollgruppe gegenübergestellt, um die Auswirkungen der pharmakologischen Behandlung und ihrer möglichen Nebenwirkungen auf das Verhalten, die Motorik, das Schmerzempfinden und die Gewichtsentwicklung zu untersuchen.

Miglustat selbst greift als reversibler Inhibitor der Glucosylceramidsynthese in die Glucosylceramidsynthese ein. Dadurch können weniger Glycosphingolipide und deren Abkömmlinge produziert werden (Treiber et al. 2007), wodurch diese nicht mehr so stark in den Zellen akkumulieren (Zervas et al. 2001). Leider vermag es Miglustat die Symptomatik der Erkrankung nur zu stabilisieren bzw. zu mildern, eine Remission wird nicht erreicht (Patterson et al. 2007). Zu den unerwünschten Nebenwirkungen zählen hämatologische Veränderungen, Diarrhö, Kohlenhydratmalabsorption mit einhergehendem Gewichtsverlust, sowie neurologische und psychiatrische Veränderungen (Fachinformation Zavesca[®], Pineda et al. 2010, Wraith et al. 2010). D'Arcangelo et al. konnten in einer vor kurzem erschienen Studie zeigen, dass die neurologische Symptomatik bei BALB/c NPC^{-/-}-Tieren mit einer

Verringerung des Aufbaus und Aufrechterhaltens von synaptischen Verbindungen im Zusammenhang mit einer Verringerung der Phosphorylierung von ERKs einhergeht (D'Arcangelo et al. 2016). Unter Miglustattherapie konnten die negativen Effekte auf die synaptische Plastizität ausgeglichen werden. Es wird vermutet, dass Miglustat den gestörten Lipidstoffwechsel normalisiert, ohne jedoch auf die Cholesterinspiegel Einfluss zu nehmen. In unserem Versuch wurde Miglustat Wildtypmäusen verabreicht. Dies könnte zu Veränderungen in der Zusammensetzung der Zellmembranen, genauer gesagt besonders an lipid rafts, führen. Lipid rafts sind Mikrodomänen, die entscheidend an der Zell-Zellkommunikation beteiligt sind. So sind sie zum Beispiel an der Regulation der Neurotransmitterfreisetzung und an der Aktivität von Glutamatrezeptoren beteiligt (Becher et al. 2008, Brachet et al. 2015).

Cyclodextringabe führt zu einer Verringerung der intraneuralen Cholesterin- und Gangliosidakkumulation, sowie der freien Sphingosinakkumulation (Davidson et al. 2009, Liu et al. 2009). Durch Freisetzung des in späten Endosomen bzw. Lysosomen sequestrierten Cholesterins trägt es zur Normalisierung der gestörten Zellfunktion und darüber zur Verlängerung des Überlebens bei. Da Cyclodextrin allerdings eine sehr eingeschränkte Hirnpassage besitzt, ist bisher unklar wie es dort seine Wirkung bei systemischer Gabe entfaltet (Pontikis et al. 2013). Vor allem eine Besserung der Hepatosplenomegalie wird bei intravenöser Gabe beobachtet (Matsuo et al. 2013). Dosen, die zu einer Besserung der neurologischen Symptomatik führen, weisen erhöhte Lungentoxizität auf, die in einem Fall zu einer schweren Lungenentzündung mit Lungenfibrosierung führte (Vite et al. 2015, Matsuo et al. 2013). Intrathekale Gabe hingegen umgeht die Bluthirnschranke und vermeidet eine Lungenbeteiligung, allerdings bringen therapeutische Dosen auch eine erhöhte Ototoxizität mit sich, welche wahrscheinlich auf das Entfernen des Cholesterins aus den Membranen der Haarzellen zurück zu führen ist (Davidson et al. 2016, Crumling et al. 2012). Tanaka et al. konnten 2014 eine höhere Toleranz gegenüber Cyclodextrin bei *NPCI^{-/-}*-CHO-Zellen, aufgrund der höheren Cholesterinspiegel, feststellen. Der Einfluss von Cyclodextrin auf Zellen scheint über die reine Cholesterinentfernung hinaus zu gehen. Es konnte gezeigt werden, dass hippocampale Rattenneuronen eine verringerte NMDA-Rezeptorplastizität besitzen (Frank et al. 2008). Flusskrebsmuskelnzellen zeigen nach Cyclodextrinbehandlung eine verringerte Reaktion auf L-Glutamat, was einen direkten Effekt auf Glutamatrezeptoren nahelegt (Ormerod et al. 2012).

Im Tierexperiment mit Katzen konnte ein verzögerter Krankheitsbeginn und -progress beobachtet werden (Vite et al. 2015). Eine seit Dezember 2012 in den USA laufende Studie,

bei welcher Cyclodextrin intraventrikulär beim Menschen angewandt wird, wird voraussichtlich Ende 2016 erste Ergebnisse liefern (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT01747135>, zuletzt aufgerufen am 14.10.2016).

Die Wirksamkeit des Neurosteroids Allopregnanolon gilt als umstritten, wurden doch die zunächst angenommene Effekte letztendlich und hauptsächlich auf das Transportmedium Cyclodextrin zurückgeführt (Davidson et al. 2009, Liu et al. 2009). Zusammen mit Cyclodextrin konnte dennoch eine lebensverlängernde Wirkung des Allopregnanolons nachgewiesen werden (Davidson et al. 2009). Des Weiteren besitzt Allopregnanolon neuroprotektive Eigenschaften, wie die Reduktion oxydativen Stresses in NPC1^{-/-}-Fibroblastenkulturen (Zampieri et al. 2009), der als ein entscheidender Faktor der Neurodegeneration bei NPC angesehen wird (Vazquez et al. 2012). Außerdem führt es bei Hirnverletzungen zu einer geringeren Gliazellaktivierung und damit verringerten Infarktgröße (Ishrat et al. 2010). In einer Studie aus dem Jahr 2013 konnte außerdem gezeigt werden, dass Allopregnanolon bei Rückenmarksverletzungen das Absterben von Motoneuronen verhindern kann. Derselben Effekte konnte allerdings auch unter 5α-DHP-Suppression durch Progesteron erzielt werden (Labombarda et al. 2013). Sollte dies auch für andere Zellen des ZNS gelten, könnte dies der Grund sein, warum der Mangel an 5α-DHP bei NPC und der damit einhergehende Allopregnanolonmangel klinisch eine untergeordnete Rolle spielt, da die Zellen diesen Mangel durch die Progesteronwirkung teilweise kompensieren können.

Allopregnanolon scheint synergistisch zusammen mit Cyclodextrin zu wirken und ist daher weiterhin Teil des sogenannten SRT/BPT-Schemas, konnte dieses Behandlungsschema doch einen verringerten Verlust an Purkinjezellen im Tierversuch zeigen (Davidson et al. 2009, Maas und Petersen et al. 2015).

4.2 Gewichtsentwicklung der Tiere

Versuchstiere, die zur Erforschung von NPC genutzt werden, wie Tiere der BALB/c Nctr-Npc1^{m1N}/J-Linie, fallen neben dem NPC typischen Phänotyp ab P42 durch ein geringeres Körpergewicht auf (Davidson et al., 2009). Dieser Entwicklung kann durch die kombinierte Gabe von Miglustat zusammen mit Cyclodextrin und Allopregnanolon entgegengewirkt werden, wobei behandelte Tiere zunächst ein etwas geringeres Körpergewicht aufweisen, als die Kontrolltiere. Erst im Verlauf überholen sie diese (Davidson et al., 2009).

Um eine pharmakainduzierte verringerte Gewichtszunahme zu untersuchen, wurden von uns Wildtypen der BALB/c Nctr-Npc1^{m1N}/J-Linie mit der Kombinationsbehandlung und einer reinen Miglustatbehandlung einer Gruppe scheinbehandelter Tiere (Sham) gegenübergestellt.

Von Miglustat ist bereits eine Gewichtsreduktion als Nebenwirkung beschrieben, (Fachinformation Zavesca®), u.a. durch eine Hemmung der Disaccharidasen im Darm und einer Reduktion des Appetits, die wir allerdings bei der Gruppe Miglu anhand der Körpergewichtsdaten nicht nachvollziehen konnten. Viel mehr zeichnete sich eine geringe Gewichtsentwicklung der Gruppe Kombi ab P10 ab, die bis P67. Das Gewicht entwickelte sich parallel zu den anderen untersuchten Gruppen. Da sich die Tiere, die nur eine Miglustatbehandlung erhielten, wie die scheinbehandelten Tiere der Gruppe Sham entwickelten, muss eine andere Komponente oder ein Synergismus mehrerer Komponenten der Kombinationsbehandlung für das geringere Körpergewicht der Tiere verantwortlich sein. Vermutlich handelt es sich hierbei um einen kombinierten Effekt des Cyclodextrins mit Miglustat. Cyclodextrin ist ein zyklisches Oligosaccharid, das aufgrund seiner Molekülstruktur in der Lage ist, schlecht wasserlösliche Stoffe wie Lipide in eine wasserlösliche Form zu überführen. Tatsächlich konnten Studien an gesunden Menschen, die zum normalen Essen α -Cyclodextrin oral einnahmen, zeigen, dass Cyclodextrin in der Lage ist die Blutfettwerte wie Triglyceride, LDL-Cholesterin und Apolipoprotein B zu senken und darüber hinaus eine Gewichtsreduktion zu vermitteln (Comerford et al. 2011, Jarosz et al. 2013). Ursächlich ist u.a. eine Bindung der Nahrungsfette, was diese für den Körper nicht nutzbar macht. Das Binden hydrophober Substanzen ist eine Gemeinsamkeit aller Cyclodextrine und Interaktionen zwischen verschiedenen Cyclodextrinen mit diversen Lipiden konnte erst vor kurzem von Davidson et al. gezeigt werden (Davidson et al. 2016). Besonders β -Cyclodextrin scheint sich negativ auf die Stabilität von Liposomen auszuwirken. Es zerstört Vesikel und löst die darin enthaltenen Substanzen durch Affinität zu sowohl Cholesterin, als auch zu Phosphatidylcholin, beides wichtige Komponenten der Liposomenmembran (Hatzi et al. 2007, Piel et al. 2007)

Des Weiteren setzt Cyclodextrin, systemisch gegeben, Cholesterin aus den endoplasmatischen Speichern frei, ohne dass dieses aber dann vom Körper ausgeschieden wird. Diese Freisetzung führt zu verminderter Aktivität der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase, kurz HMGCoA-Reduktase, welche für die endogene Cholesterinsynthese verantwortlich ist (Taylor et al. 2012). Daraus resultieren schließlich geringere Cholesterinspiegel für die Zellen.

Um den Einfluss von Cyclodextrin auf die Gewichtsentwicklung genauer zu untersuchen, wurden Daten von Tieren, die ausschließlich Cyclodextrin erhielten, ausgewertet. (Abbildung 32) Diese Daten wurden innerhalb unserer Arbeitsgruppe im Rahmen ähnlicher Versuche generiert (bisher unveröffentlicht, Wree et al.). Cyclodextrin allein scheint keinen

Einfluss auf die Gewichtsentwicklung zu haben. Dafür zeigen die mit der Kombination aus Cyclodextrin, Allopregnanolon und Miglustat behandelten Tiere wieder ein insgesamt geringeres Körpergewicht, das sich parallel zu den anderen Tieren entwickelt. Die Unterschiede sind an P14 ($p < 0,001$), P28 und P42 signifikant ($p < 0,01$).

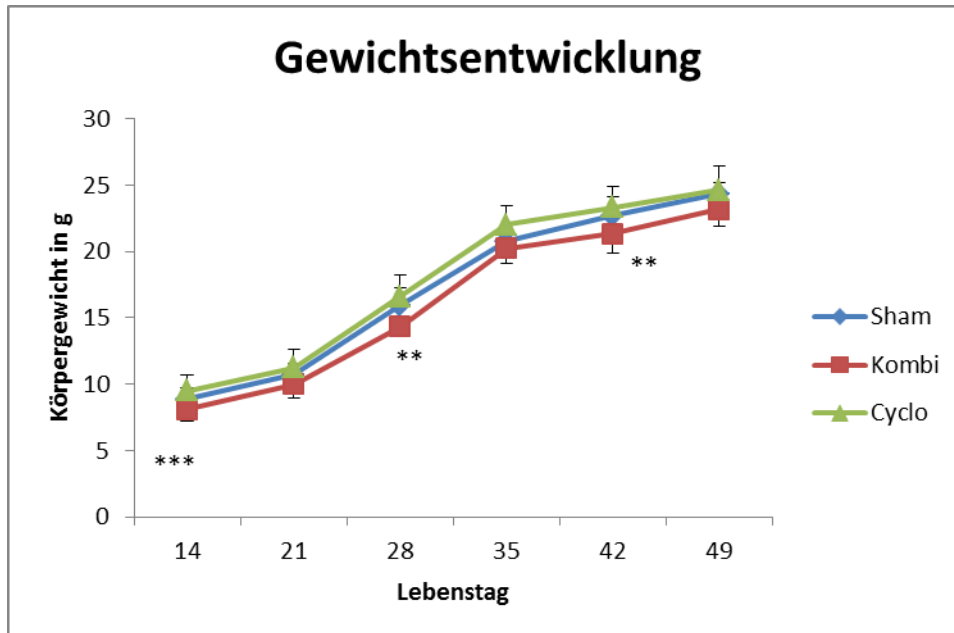


Abb.32 Körpergewichtsentwicklung im Vergleich: Sham, Kombi und Cyclo-only. Die Kombitiere weisen ein geringeres Körpergewicht, als die Tiere der anderen Gruppen, auf.

In Verbindung mit unseren Daten ist ein synergistischer Effekt von Miglustat und Cyclodextrin auf die Gewichtsentwicklung der Tiere wahrscheinlich, welcher sich vermutlich aus einem Energiemangel durch die gehemmte Kohlenhydratverwertung im Darm und verringerten Lipidspiegeln, wie Cholesterin, zusammensetzt.

Über Allopregnanolon liegen keine Daten im Zusammenhang mit Gewichtsverlust oder niedrigerem Körpergewicht vor.

Bei der Hirngewichtsbestimmung zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den behandelten Gruppen zu den scheinbehandelten Tieren. Der Unterschied im Hirngewicht könnte bei Kombi noch durch das insgesamt verringerte Körpergewicht erklärt werden, nicht aber bei Miglu. Da sich aber auch die Gruppe Miglu von den scheinbehandelten Tieren der Gruppe Sham unterscheidet, ist davon auszugehen, dass Miglustat durch die Hemmung der Glucosylceramidsynthese Einfluss auf das Hirnwachstum nimmt. Miglustat blockiert als Inhibitor der Glucosylceramidsynthase die Bildung von Glycosphingolipiden. Diese spielen eine wichtige Rolle bei der Membransynthese, Zell-Zellkommunikation, Zelladhäsion, Differenzierung, Migration und beim Gewebewachstum (Treiber et al. 2007, Klock et al.

2015, Lehninger Principles of Biochemistry, 4th ed. New York). Über Cyclodextrin ist bekannt, dass es über die Entfernung von Cholesterin aus Plasmamembranen Einfluss auf die Gewebeplastizität des Vorderhirns bei Krallenfröschen nimmt (Reis et al. 2012). Es ist anzunehmen, dass Miglustat und Cyclodextrin durch Veränderung in der Lipidzusammensetzung von Membranen Einfluss auf die Myelinisierung nehmen. Diese beginnt bei Nagern um P10, in unserem Fall nach Beginn der Therapie (Jacobson 1963, Karlsson 1967).

4.3 Elevated Plus Maze

Das Elevated Plus Maze ist ein Verhaltenstest, der aufgrund seines Aufbaues mit zwei „offenen“ Armen und zwei „geschlossenen“ Armen, bei den Tieren einen Annäherungs-Vermeidungskonflikt auslöst (Cruz et al. 1994, Pellow und File 1985). Dieses Modell wird häufig zur Erforschung anxiolytischer Pharmaka genutzt, da diese beispielsweise die Aufenthaltsdauer im offenen Bereich verlängern und dessen Besuchszahl erhöhen. Anxiogene Substanzen dagegen erhöhen u.a. die Aufenthaltsdauer in den geschlossenen Bereichen (Handley und Mithani 1984, File 1987, Pellow et al. 1985, Rodgers und Cole 1993). Es kann somit eine Aussage über den Grad der Beeinträchtigung des Verhaltens durch den Parameter Angst getroffen werden.

Des Weiteren kann die Spontanmotorik untersucht werden. Diese wird zumeist über die Besuchszahl der unterschiedlichen Bereiche beurteilt (File 1985).

Unsere Ergebnisse in diesem Test zeigen ein verändertes Verhalten der mit Miglustat behandelten Gruppen Kombi und Miglu. Beide Gruppen verbrachten weniger Zeit in den offenen Bereichen und besuchten diese seltener als die scheinbehandelten Tiere der Gruppe Sham. Wir schließen daher auf eine Steigerung der Ängstlichkeit durch das gegebene Miglustat, was durch die verringerte motorische Aktivität untermauert wird. Dies steht im Einklang mit den bekannten psychiatrischen Nebenwirkungen von Miglustat, wie Depression (Fachinformation Zavesca®).

Zusätzlich zum Miglustat könnte auch Allopregnanolon, zumindest bei den Tieren der Gruppe Kombi, zu einer erhöhten Ängstlichkeit geführt haben.

Allopregnanolon soll anxiolytische und sedierende Wirkung besitzen (Reddy 2010), aber auch in gewissen Konzentrationen anxiogen wirken (Bäckström et al. 2011). Es besitzt eine U-förmige Wirkungskurve. Niedrige und hohe Konzentrationen aktivieren den Rezeptor, während mittlere Konzentrationen dies nicht können, wodurch die positiven Effekte wie Anxiolyse nicht zum Tragen kommen (Bäckström et al. 2011). Als mittelhoher Bereich geben

Bäckström et al. die physiologische Konzentration des Hormons während der Lutealphase des Menstruationszyklus` der Frau an. Daten für Mäuse liegen nicht vor.

4.4 Open Field

Der Open Field Test ist ein Spontanmotoriktest, der sich auch zur Beurteilung von ängstlichem Verhalten nutzen lässt. Ähnlich dem EPM wird auch hier ein Annäherungs-Vermeidungskonflikt durch die wandnahen Bereiche und den zentralen, offenen Bereich ausgelöst (Defries et al. 1966). Die gleichzeitig über den Parameter Geschwindigkeit erfasste Spontanmotorik kann Auskunft über das Angstempfinden geben (Buuse et al. 2000), aber auch über eventuelle motorische Einschränkungen oder Beeinflussungen durch eine Behandlung oder Erkrankung, wie beispielsweise bei NPC. Wir konnten im Open Field keine Unterschiede der betrachteten Gruppen in den Bereichen Erkundungsverhalten, wie der relativen Zentrumsstrecke als Angstmarker (Dennenberg 1969), oder Spontanmotorik feststellen. Das Open Field ist ein guter Test zur Betrachtung von Spontanmotorik und Erkundungsverhalten, während das EPM besonders zur Erforschung von ängstlichem Verhalten geeignet ist (Lister 1987, Handley et Mithani 1984, Hogg 1996, Walf et Frye 2007).

Studien, die u.a. diese beiden Tests verglichen, konnten keine positive Korrelation zwischen den von ihnen gewählten Hauptparametern für Ängstlichkeit finden (Sudakov et al. 2013, Lalonde und Strazielle 2008). Daraus lässt sich ableiten, dass Tiere, die in einem Test ein ängstliches Verhalten zeigen, sich im nächsten Test anders verhalten können, wie wir es bei unseren Versuchen gesehen haben.

4.5 Hot Plate

Der Hot Plate Test gehört zu den am meisten angewandten Schmerztests zur Detektion von Störungen des Schmerzempfindens bzw. zur Prüfung analgetisch wirkender Pharmaka (Pick et al. 1991). Periphere Neuropathie und Hypästhesie, also unter anderem ein herabgesetztes Schmerzempfinden, gehören zu den häufigen (>1/100) Nebenwirkungen des Miglustats (Fachinformation Zavesca®, Hollak et al. 2009). Bei Allopregnanolon oder Cyclodextrin sind Nebenwirkungen im Bereich des zentralen oder peripheren Nervensystems nicht bekannt.

Unsere Ergebnisse zeigen einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen Kombi und Miglu, ohne signifikanten Unterschied zur Gruppe Sham. Wir können vermuten, dass Miglustat zu einer Schädigung der peripheren Nervenfasern geführt hat. Die Gruppe Kombi erhielt ebenfalls Miglustat, zeigt aber keine Verlängerung in der Reaktionszeit auf einen Schmerzreiz. Dies kann auf das gegeben Cyclodextrin oder Allopregnanolon zurückgeführt

werden, vor allem da Allopregnanolon neuroprotektive Effekte zugeschrieben werden (Reddy 2010).

5. Zusammenfassung

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen bislang nicht bekannte Auswirkungen der in der Therapie des NPC angewandten Pharmaka. Bei gesunden Wildtyptieren führen diese u.a. zu Verhaltensänderungen. Wir konnten in Wildtypmäusen zeigen, dass die Miglustatgabe zu einem verringerten Hirngewicht führt, sowie dass die Kombinationsbehandlung mit Miglustat, Allopregnanolon und Cyclodextrin neben einem geringeren Hirngewicht auch ein verringertes Körpergewicht zur Folge hat.

Auswirkungen auf das Verhalten und die Emotionalität konnten wir im Elevated Plus Maze Test zeigen. Diese belegen eine Beeinflussung der Emotionalität durch Miglustat in Form einer erhöhten Ängstlichkeit der Tiere.

Einschränkungen des Schmerzempfindens konnten wir bei der Gruppe Miglu zeigen. Dies kann einen negativen Effekt des Miglustats auf die Funktion von Nervenzellen belegen. Allopregnanolon und Cyclodextrin scheinen hingegen vor diesen Effekten zu schützen, da die damit behandelten Tiere keine gestörte Reizwahrnehmung zeigten.

Wir können also in Bezug auf die Fragestellungen dieser Arbeit konstatieren, dass

1. Miglustat bzw. die Kombinationsbehandlung einen Einfluss auf das Verhalten und die Emotionalität der Tiere in Form einer erhöhten Ängstlichkeit hat,
2. Allopregnanolon/Cyclodextrin ebenfalls für Verhaltensänderungen ursächlich sein könnten und dass es vor den neuropathischen Nebenwirkungen des Miglustats zu schützen scheint,
3. Miglustat zu peripherer Neuropathie führt, was bei einer Kombinationsbehandlung mit Cyclodextrin und Allopregnanolon nicht auftritt,
4. die Kombinationsbehandlung zu einem geringeren Körper- und Hirngewicht führt, während eine reine Miglustatgabe nur zu einem verringerten Hirngewicht führt,
5. der reine Injektionsreiz zu keiner Änderung in Verhalten oder Spontanmotorik führt.

Weitere Experimente, die die einzelnen Substanzen genauer untersuchen, sind notwendig, um die hier dargelegten Ergebnisse zu erweitern. Besonders die Unterscheidung zwischen positiven Effekten der einzelnen Substanzen auf den Krankheitsverlauf bei *NPC^{-/-}*-Tieren und den negativen, in dieser Studie aufgezeigten, Nebenwirkungen bei Wildtyptieren wäre wichtig.

6. Literaturverzeichnis

- Alam, M. S.; Getz, M.; Haldar, K. (2016): Chronic administration of an HDAC inhibitor treats both neurological and systemic Niemann-Pick type C disease in a mouse model. In: *Science translational medicine* 8 (326), S. 326ra23.
- Alvarez, A. R.; Klein, A.; Castro, J.; Cancino, G. I.; Amigo, J.; Mosqueira, M. et al. (2008): Imatinib therapy blocks cerebellar apoptosis and improves neurological symptoms in a mouse model of Niemann-Pick type C disease. In: *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22 (10), S. 3617–3627.
- Arish, M.; Husein, A.; Kashif, M.; Saleem, M.; Akhter, Y.; Rub, A. (2015): Sphingosine-1-phosphate signaling: unraveling its role as a drug target against infectious diseases. In: *Drug discovery today*.
- Badishtov, B. A.; Overstreet, D. H.; Kashevskaya, O. P.; Viglinskaya, I. V.; Kampov-Polevoy, A. B.; Seredenin, S. B.; Halikas, J. A. (1995): To drink or not to drink: open field behavior in alcohol-preferring and-nonpreferring rat strains. In: *Physiology & behavior* 57 (3), S. 585–589.
- Bäckström, T.; Haage, D.; Löfgren, M.; Johansson, I. M.; Strömberg, J.; Nyberg, S. et al. (2011): Paradoxical effects of GABA-A modulators may explain sex steroid induced negative mood symptoms in some persons. In: *Neuroscience* 191, S. 46–54.
- Balch, W. E.; Morimoto, R. I.; Dillin, A.; Kelly, J. W. (2008): Adapting proteostasis for disease intervention. In: *Science (New York, N.Y.)* 319 (5865), S. 916–919.
- Barlow, C.; Hirotsune, S.; Paylor, R.; Liyanage, M.; Eckhaus, M.; Collins, F. et al. (1996): Atm-deficient mice: a paradigm of ataxia telangiectasia. In: *Cell* 86 (1), S. 159–171.
- Barnham, K. J.; Bush, A. I. (2008): Metals in Alzheimer's and Parkinson's diseases. In: *Current opinion in chemical biology* 12 (2), S. 222–228.
- Bartke, N.; Hannun, Y. A. (2009): Bioactive sphingolipids: metabolism and function. In: *Journal of lipid research* 50 Suppl, S. S91-6.
- Baulieu, E. (2000): Progesterone as a neuroactive neurosteroid, with special reference to the effect of progesterone on myelination. In: *Steroids* 65 (10-11), S. 605–612.
- Becher, A.; White, J. H.; McIlhinney, R. A. (2001): The gamma-aminobutyric acid receptor B, but not the metabotropic glutamate receptor type-1, associates with lipid rafts in the rat cerebellum. In: *Journal of neurochemistry* 79 (4), S. 787–795.
- Brachet, A.; Norwood, S.; Brouwers, J. F.; Palomer, E.; Helms, J. B.; Dotti, C. G.; Esteban, J. A. (2015): LTP-triggered cholesterol redistribution activates Cdc42 and drives AMPA receptor synaptic delivery. In: *The Journal of cell biology* 208 (6), S. 791–806.
- Carstea, E. D.; Morris, J. A.; Coleman, K. G.; Loftus, S. K.; Zhang, D.; Cummings, C. et al. (1997): Niemann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis. In: *Science (New York, N.Y.)* 277 (5323), S. 228–231.
- Cao, C.; Leng, Y.; Kufe, D. (2003): Catalase activity is regulated by c-Abl and Arg in the oxidative stress response. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (32), S. 29667–29675.
- Cao, C.; Leng, Y.; Liu, X.; Yi, Y.; Li, P.; Kufe, D. (2003): Catalase is regulated by ubiquitination and proteosomal degradation. Role of the c-Abl and Arg tyrosine kinases. In: *Biochemistry* 42 (35), S. 10348–10353.
- Chien, Y.-H.; Shieh, Y.-D.; Yang, C.-Y.; Lee, N.-C.; Hwu, W.-L. (2013): Lung toxicity of hydroxypropyl- β -cyclodextrin infusion. In: *Molecular genetics and metabolism* 109 (2), S. 231–232.
- Comerford, K. B.; Artiss, J. D.; Jen, K. L. C.; Karakas, S. E. (2011): The beneficial effects of α -cyclodextrin on blood lipids and weight loss in healthy humans. In: *Obesity (Silver Spring, Md.)* 19 (6), S. 1200–1204.
- Crawley, J. N. (1985): Exploratory behavior models of anxiety in mice. In: *Neuroscience and biobehavioral reviews* 9 (1), S. 37–44.
- Crocker, A. C. (1961): The cerebral defect in Tay-Sachs disease and Niemann-Pick disease. In: *Journal of neurochemistry* 7, S. 69–80.

6. Literaturverzeichnis

- Crumling, M. A.; Liu, L.; Thomas, P. V.; Benson, J.; Kanicki, A.; Kabara, L. et al. (2012): Hearing loss and hair cell death in mice given the cholesterol-chelating agent hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. In: *PloS one* 7 (12), S. e53280.
- Cruz, A. P.; Frei, F.; Graeff, F. G. (1994): Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. In: *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 49 (1), S. 171–176.
- D'Arcangelo, G.; Grossi, D.; Racaniello, M.; Cardinale, A.; Zaratti, A.; Rufini, S. et al. (2016): Miglustat Reverts the Impairment of Synaptic Plasticity in a Mouse Model of NPC Disease. In: *Neural plasticity* 2016, S. 3830424.
- Davidson, C. D.; Ali, N. F.; Micsenyi, M. C.; Stephney, G.; Renault, S.; Dobrenis, K. et al. (2009): Chronic cyclodextrin treatment of murine Niemann-Pick C disease ameliorates neuronal Cholesterin and glycosphingolipid storage and disease progression. In: *PloS one* 4 (9), S. e6951.
- Davidson, C. D.; Fishman, Y. I.; Puskas, I.; Szeman, J.; Sohajda, T.; McCauliff, L. A. et al. (2016): Efficacy and ototoxicity of different cyclodextrins in Niemann-Pick C disease. In: *Annals of clinical and translational neurology* 3 (5), S. 366–380.
- DeFries, J. C.; Hegmann, J. P.; Weir, M. W. (1966): Open-field behavior in mice: evidence for a major gene effect mediated by the visual system. In: *Science (New York, N.Y.)* 154 (3756), S. 1577–1579.
- Denenberg, V. H.: Open-Field Behavior in the Rat: What does it mean?*. In: *La fayette, Ind.*
- Devlin, C.; Pipalia, N. H.; Liao, X.; Schuchman, E. H.; Maxfield, F. R.; Tabas, I. (2010): Improvement in lipid and protein trafficking in Niemann-Pick C1 cells by correction of a secondary enzyme defect. In: *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 11 (5), S. 601–615.
- Dringen, R. (2000): Metabolism and functions of glutathione in brain. In: *Progress in neurobiology* 62 (6), S. 649–671.
- Du, X.; Kumar, J.; Ferguson, C.; Schulz, T. A.; Ong, Y. S.; Hong, W. et al. (2011): A role for oxysterol-binding protein-related protein 5 in endosomal Cholesterin trafficking. In: *The Journal of cell biology* 192 (1), S. 121–135.
- Eikelis, N.; van Den Buuse, M. (2000): Cardiovascular responses to open-field stress in rats: sex differences and effects of gonadal hormones. In: *Stress (Amsterdam, Netherlands)* 3 (4), S. 319–334.
- File, S. E. (1980): The use of social interaction as a method for detecting anxiolytic activity of chlordiazepoxide-like drugs. In: *Journal of neuroscience methods* 2 (3), S. 219–238.
- File S. E. (1985): Animal models of anxiety. In: *Psychopharmacology (Berl)* 89: S4.
- File, S. E. (1987): The contribution of behavioural studies to the neuropharmacology of anxiety. In: *Neuropharmacology* 26 (7B), S. 877–886.
- Frank, C.; Rufini, S.; Tancredi, V.; Forcina, R.; Grossi, D.; D'Arcangelo, G. (2008): Cholesterol depletion inhibits synaptic transmission and synaptic plasticity in rat hippocampus. In: *Experimental neurology* 212 (2), S. 407–414.
- Gelsthorpe, M. E.; Baumann, N.; Millard, E.; Gale, S. E.; Langmade, S. J.; Schaffer, J. E.; Ory, Daniel S. (2008): Niemann-Pick type C1 I1061T mutant encodes a functional protein that is selected for endoplasmic reticulum-associated degradation due to protein misfolding. In: *The Journal of biological chemistry* 283 (13), S. 8229–8236.
- German, D. C.; Liang, C.-L.; Song, T.; Yazdani, U.; Xie, C.; Dietschy, J. M. (2002): Neurodegeneration in the Niemann-Pick C mouse: glial involvement. In: *Neuroscience* 109 (3), S. 437–450.
- German, D. C.; Quintero, E. M.; Liang, C.; Xie, C.; Dietschy, J. M. (2001): Degeneration of neurons and glia in the Niemann-Pick C mouse is unrelated to the low-density lipoprotein receptor. In: *Neuroscience* 105 (4), S. 999–1005.
- Gould, S.; Scott, R. C. (2005): 2-Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (HP-beta-CD): a toxicology review. In: *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 43 (10), S. 1451–1459.

6. Literaturverzeichnis

- Gomez-Muñoz, A.; Presa, N.; Gomez-Larrauri, A.; Rivera, I.-G.; Trueba, M.; Ordoñez, M. (2015): Control of inflammatory responses by ceramide, sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate. In: *Progress in lipid research*.
- Griffin, L. D.; Gong, W.; Verot, L.; Mellon, S. H. (2004): Niemann-Pick type C disease involves disrupted neurosteroidogenesis and responds to allopregnanolone. In: *Nature medicine* 10 (7), S. 704–711.
- Handley, S. L.; Mithani, S. (1984): Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. In: *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 327 (1), S. 1–5.
- Hatzi, P.; Mourtas, S.; Klepetsanis, P. G.; Antimisiaris, S. G. (2007): Integrity of liposomes in presence of cyclodextrins: effect of liposome type and lipid composition. In: *International journal of pharmaceutics* 333 (1-2), S. 167–176.
- Higashi, Y.; Murayama, S.; Pentchev, P. G.; Suzuki, K. (1993): Cerebellar degeneration in the Niemann-Pick type C mouse. In: *Acta Neuropathologica* 85 (2), S. 175–184.
- Hodges, H. (1996): Maze procedures: the radial-arm and water maze compared. In: *Brain research. Cognitive brain research* 3 (3-4), S. 167–181.
- Hogg, S. (1996): A review of the validity and variability of the Elevated Plus-Maze as an animal model of anxiety. In: *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 54 (1), S. 21–30.
- Hollak, C. E. M.; Hughes, D.; van Schaik, I. N.; Schwierin, B.; Bembi, B. (2009): Miglustat (Zavesca) in type 1 Gaucher disease: 5-year results of a post-authorisation safety surveillance programme. In: *Pharmacoepidemiology and drug safety* 18 (9), S. 770–777.
- Hovakimyan, M.; Stachs, O.; Reichard, M.; Mascher, H.; Lukas, J.; Frech, M. J. et al. (2011): Morphological alterations of the cornea in the mouse model of niemann-pick disease type c1. In: *Cornea* 30 (7), S. 796–803.
- Hovakimyan, M.; Maass, F.; Petersen, J.; Holzmann, C.; Witt, M.; Lukas, J. et al. (2013): Combined therapy with cyclodextrin/allopregnanolone and miglustat improves motor but not cognitive functions in Niemann-Pick Type C1 mice. In: *Neuroscience* 252, S. 201–211.
- Hovakimyan, M.; Meyer, A.; Lukas, J.; Luo, J.; Gudziol, V.; Hummel, T. et al. (2013): Olfactory deficits in Niemann-Pick type C1 (NPC1) disease. In: *PloS one* 8 (12), S. e82216.
- Infante, R. E.; Wang, M. L.; Radhakrishnan, A.; Kwon, H. J.; Brown, M. S.; Goldstein, J. L. (2008): NPC2 facilitates bidirectional transfer of Cholesterin between NPC1 and lipid bilayers, a step in Cholesterin egress from lysosomes. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (40), S. 15287–15292.
- Ishrat, T.; Sayeed, I.; Atif, F.; Hua, F.; Stein, D. G. (2010): Progesterone and allopregnanolone attenuate blood-brain barrier dysfunction following permanent focal ischemia by regulating the expression of matrix metalloproteinases. In: *Experimental neurology* 226 (1), S. 183–190.
- Jacobson, S. (1963): Sequence of myelinization in the brain of the albino rat. A. Cerebral cortex, thalamus and related structures. In: *The Journal of comparative neurology* 121, S. 5–29.
- Jarosz, P. A.; Fletcher, E.; Elserafy, E.; Artiss, J. D.; Jen, K.-L. C. (2013): The effect of α -cyclodextrin on postprandial lipid and glycemic responses to a fat-containing meal. In: *Metabolism: clinical and experimental* 62 (10), S. 1443–1447.
- Jones, B. J.; Roberts, D. J. (1968): A rotarod suitable for quantitative measurements of motor incoordination in naive mice. In: *Naunyn-Schmiedebergs Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie* 259 (2), S. 211.
- Karl, T.; Pabst, R.; von Hörsten, S. (2003): Behavioral phenotyping of mice in pharmacological and toxicological research. In: *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft für Toxikologische Pathologie* 55 (1), S. 69–83.
- Karlsson, U. (1967): Observations on the postnatal development of neuronal structures in the lateral geniculate nucleus of the rat by electron microscopy. In: *Journal of ultrastructure research* 17 (1), S. 158–175.
- Klokk, T. I.; Kavaliauskiene, S.; Sandvig, K. (2015): Cross-linking of glycosphingolipids at the plasma membrane: consequences for intracellular signaling and traffic. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS*.
- Labombarda, F.; Ghomari, A. M.; Liere, P.; de Nicola, A. F.; Schumacher, M.; Guennoun, R. (2013): Neuroprotection by steroids after neurotrauma in organotypic spinal cord cultures: a key role for progesterone receptors and steroidal modulators of GABA(A) receptors. In: *Neuropharmacology* 71, S. 46–55.

6. Literaturverzeichnis

- Lalonde, R.; Strazielle, C. (2008): Relations between open-field, elevated plus-maze, and emergence tests as displayed by C57/BL6J and BALB/c mice. In: *Journal of neuroscience methods* 171 (1), S. 48–52.
- Lister, R. G. (1987): The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. In: *Psychopharmacology* 92 (2), S. 180–185.
- Liu, B.; Turley, S. D.; Burns, D. K.; Miller, A. M.; Repa, J. J.; Dietschy, J. M. (2009): Reversal of defective lysosomal transport in NPC disease ameliorates liver dysfunction and neurodegeneration in the npc1^{-/-} mouse. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (7), S. 2377–2382.
- Lloyd-Evans, E.; Morgan, A. J.; He, X.; Smith, D. A.; Elliot-Smith, E.; Sillence, D. J. et al. (2008): Niemann-Pick disease type C1 is a sphingosine storage disease that causes deregulation of lysosomal calcium. In: *Nature medicine* 14 (11), S. 1247–1255.
- Marí, M.; Caballero, F.; Colell, A.; Morales, A.; Caballeria, J.; Fernandez, A. et al. (2006): Mitochondrial free Cholesterin loading sensitizes to TNF- and Fas-mediated steatohepatitis. In: *Cell metabolism* 4 (3), S. 185–198.
- Maass, F.; Petersen, J.; Hovakimyan, M.; Schmitt, O.; Witt, M.; Hawlitschka, A. et al. (2015): Reduced cerebellar neurodegeneration after combined therapy with cyclodextrin/allopregnanolone and miglustat in NPC1: a mouse model of Niemann-Pick type C1 disease. In: *Journal of neuroscience research* 93 (3), S. 433–442.
- Maarup, T. J.; Chen, A. H.; Porter, F. D.; Farhat, N. Y.; Ory, D. S.; Sidhu, R. et al. (2015): Intrathecal 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin in a single patient with Niemann-Pick C1. In: *Molecular genetics and metabolism* 116 (1-2), S. 75–79.
- Marin, T.; Contreras, P.; Castro, J. F.; Chamorro, D.; Balboa, E.; Bosch-Morato, M. et al. (2014): Vitamin E dietary supplementation improves neurological symptoms and decreases c-Abl/p73 activation in Niemann-Pick C mice. In: *Nutrients* 6 (8), S. 3000–3017.
- Matsuo, M.; Togawa, M.; Hirabaru, K.; Mochinaga, S.; Narita, A.; Adachi, M. et al. (2013): Effects of cyclodextrin in two patients with Niemann-Pick Type C disease. In: *Molecular genetics and metabolism* 108 (1), S. 76–81.
- Maue, R. A.; Burgess, R. W.; Wang, B.; Wooley, C. M.; Seburn, K. L.; Vanier, M. T. et al. (2012): A novel mouse model of Niemann-Pick type C disease carrying a D1005G-Npc1 mutation comparable to commonly observed human mutations. In: *Human molecular genetics* 21 (4), S. 730–750.
- Meikle, P. J. (1999): Prevalence of Lysosomal Storage Disorders. In: *JAMA* 281 (3), S. 249.
- Mengel, E.; Beck, M.; Das, A. M.; Ebinger, F.; Koch, S.; Klünemann, H. H. et al. (2012): Morbus Niemann-Pick Typ C. In: *Monatsschr Kinderheilkd* 160 (1), S. 47–54.
- Miyawaki, S.; Mitsuoka, S.; Sakiyama, T.; Kitagawa, T. (1982): 1982-Miyawaki-New Mutation // Sphingomyelinosis, a new mutation in the mouse: a model of Niemann-Pick disease in humans. In: *The Journal of heredity* 73 (4), S. 257–263.
- Montgomery, K. C. (1955): The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. In: *Journal of comparative and physiological psychology* 48 (4), S. 254–260.
- Morris, M. D.; Bhuvaneshwaran, C.; Shio, H.; Fowler, S. (1982): Lysosome Lipid Storage Disorder in NCTR-BALB/c Mice. In: *American Journal of Pathology* 108(2), S. 140–149.
- Morris, R. (1984): Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. In: *Journal of Neuroscience Methods* 11 (1), S. 47–60.
- Neefjes, J.; van der Kant, R. (2014): Stuck in traffic: an emerging theme in diseases of the nervous system. In: *Trends in neurosciences* 37 (2), S. 66–76.
- Nelson, D. L.; Cox, M. M.; Lehninger, A. L.; Nelson, D. L. (2005): *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4th ed. New York: W.H. Freeman.
- Neufeld, E. B.; Wastney, M.; Patel, S.; Suresh, S.; Cooney, A. M.; Dwyer, N. K. et al. (1999): The Niemann-Pick C1 protein resides in a vesicular compartment linked to retrograde transport of multiple lysosomal cargo. In: *The Journal of biological chemistry* 274 (14), S. 9627–9635.
- Ormerod, K. G.; Rogasevskaia, T. P.; Coorssen, J. R.; Mercier, A. J. (2012): Cholesterol-independent effects of methyl-beta-cyclodextrin on chemical synapses. In: *PloS one* 7 (5), S. e36395.
- Park, W. D.; O'Brien, J. F.; Lundquist, P. A.; Kraft, D. L.; Vockley, C. W.; Karnes, P. S. et al. (2003): Identification of 58 novel mutations in Niemann-Pick disease type C: correlation with biochemical phenotype and importance of PTC1-like domains in NPC1. In: *Human mutation* 22 (4), S. 313–325.

6. Literaturverzeichnis

- Patterson, M. C.; Hendriks, C. J.; Walterfang, M.; Sedel, F.; Vanier, M. T.; Wijburg, F. (2012): Recommendations for the diagnosis and management of Niemann-Pick disease type C: an update. In: *Molecular genetics and metabolism* 106 (3), S. 330–344.
- Patterson M. C.; Vanier M. T.; Suzuki K.; Morris J. A.; Carstea E.; Neufeld E. B.; Blanchette-Mackie J. E.; Pentchev P. (2001): Niemann-Pick disease type C: a lipid trafficking disorder. In: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8th edition. S. 3611–3634.
- Patterson, M. C.; Vecchio, D.; Prady, H.; Abel, L.; Wraith, J. E. (2007): Miglustat for treatment of Niemann-Pick C disease. A randomised controlled study. In: *The Lancet Neurology* 6 (9), S. 765–772.
- Pellow, S.; Chopin, P.; File, S. E.; Briley, M. (1985): Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. In: *Journal of Neuroscience Methods* 14 (3), S. 149–167.
- Pellow, S.; File, S. E. (1986): Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. In: *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 24 (3), S. 525–529.
- Pentchev, P. G.; Gal, A. E.; Booth, A. D.; Omodeo-Sale, F.; Fouks, J.; Neumeyer, B. A. et al. (1980): A lysosomal storage disorder in mice characterized by a dual deficiency of sphingomyelinase and glucocerebrosidase. In: *Biochimica et biophysica acta* 619 (3), S. 669–679.
- Pick C. G.; Cheng, J.; Paul, D.; Pasternak, G. W. (1991): Genetic influences in opioid analgesic sensitivity in mice. In: *Brain research* 566 (1-2), S. 295–298.
- Piel, G.; Piette, M.; Barillaro, V.; Castagne, D.; Evrard, B.; Delattre, L. (2007): Study of the relationship between lipid binding properties of cyclodextrins and their effect on the integrity of liposomes. In: *International journal of pharmaceutics* 338 (1-2), S. 35–42.
- Pineda, M.; Wraith, J. E.; Mengel, E.; Sedel, F.; Hwu, W.-L.; Rohrbach, M. et al. (2009): Miglustat in patients with Niemann-Pick disease Type C (NP-C): a multicenter observational retrospective cohort study. In: *Molecular genetics and metabolism* 98 (3), S. 243–249.
- Pineda, M.; Perez-Poyato, M. S.; O'Callaghan, M.; Vilaseca, M. A.; Pocovi, M.; Domingo, R. et al. (2010): Clinical experience with miglustat therapy in pediatric patients with Niemann-Pick disease type C: a case series. In: *Molecular genetics and metabolism* 99 (4), S. 358–366.
- Pinto, R.; Caseiro, C.; Lemos, M.; Lopes, L.; Fontes, A.; Ribeiro, H. et al. (2004): Prevalence of lysosomal storage diseases in Portugal. In: *European journal of human genetics : EJHG* 12 (2), S. 87–92.
- Pontikis, C. C.; Davidson, C. D.; Walkley, S. U.; Platt, F. M.; Begley, D. J. (2013): Cyclodextrin alleviates neuronal storage of Cholesterin in Niemann-Pick C disease without evidence of detectable blood-brain barrier permeability. In: *Journal of inherited metabolic disease* 36 (3), S. 491–498.
- Poorthuis, B. J.; Wevers, R. A.; Kleijer, W. J.; Groener, J. E.; Jong, J. G. de; van Weely, S. et al. (1999): The frequency of lysosomal storage diseases in The Netherlands. In: *Human genetics* 105 (1-2), S. 151–156.
- Prut, L.; Belzung, C. (2003): The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. In: *European journal of pharmacology* 463 (1-3), S. 3–33.
- Pyne, N. J.; McNaughton, M.; Boomkamp, S.; MacRitchie, N.; Evangelisti, C.; Martelli, A. M. et al. (2015): Role of sphingosine 1-phosphate receptors, sphingosine kinases and sphingosine in cancer and inflammation. In: *Advances in biological regulation*.
- Reddy, D. S. (2010): Neurosteroids: endogenous role in the human brain and therapeutic potentials. In: *Progress in brain research* 186, S. 113–137. DOI: 10.1016/B978-0-444-53630-3.00008-7.
- Reis, A. H.; Almeida-Coburn, K. L.; Louza, M. P.; Cerqueira, D. M.; Aguiar, D. P.; Silva-Cardoso, L. et al. (2012): Plasma membrane cholesterol depletion disrupts prechordal plate and affects early forebrain patterning. In: *Developmental biology* 365 (2), S. 350–362.
- Rodgers, R. J.; Cole, J. C. (1993): Influence of social isolation, gender, strain, and prior novelty on plus-maze behaviour in mice. In: *Physiology & behavior* 54 (4), S. 729–736.
- Rubinstein, M.; Mogil, J. S.; Japón, M.; Chan, E. C.; Allen, R. G.; Low, M. J. (1996): Absence of opioid stress-induced analgesia in mice lacking beta-endorphin by site-directed mutagenesis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (9), S. 3995–4000.

6. Literaturverzeichnis

- Sanllehi, P.; Abad, J.-L.; Casas, J.; Delgado, A. (2015): Inhibitors of sphingosine-1-phosphate metabolism (sphingosine kinases and sphingosine-1-phosphate lyase). In: *Chemistry and physics of lipids*.
- Sarna, J. R.; Larouche, M.; Marzban, H.; Sillitoe, R. V.; Rancourt, D. E.; Hawkes, R. (2003): Patterned Purkinje cell degeneration in mouse models of Niemann-Pick type C disease. In: *The Journal of comparative neurology* 456 (3), S. 279–291.
- Schlegel, V.; Thieme, M.; Holzmann, C.; Witt, M.; Grittner, U.; Rolfs, A.; Wree, A. (2016): Pharmacologic treatment assigned for Niemann Pick type C1 disease partly changes behavioral traits in wild type mice. In: *International Journal of Molecular Sciences* 17 (11), S. 1866.
- Serra, S. A.; G. Ill-Raga, M. Coma et al. (2006): The role of vitamin E on intracellular signaling pathways in brain: molecular basis for the treatment of neurodegenerative processes. In: *Vitamin E: New Research*, S. 151–176.
- Sudakov, S. K.; Nazarova, G. A.; Alekseeva, E. V.; Bashkatova, V. G. (2013): Estimation of the Level of Anxiety in Rats. Differences in Results of Open-Field Test, Elevated Plus-Maze Test, and Vogel's Conflict Test. In: *Bull Exp Biol Med* 155 (3), S. 295–297.
- Rhee, S. G.; Yang, K.-S.; Kang, S. W.; Woo, H. A.; Chang, T.-S. (2005): Controlled elimination of intracellular H₂O₂: regulation of peroxiredoxin, catalase, and glutathione peroxidase via post-translational modification. In: *Antioxidants & redox signaling* 7 (5-6), S. 619–626.
- Tanaka, Y.; Ishitsuka, Y.; Yamada, Y.; Kondo, Y.; Takeo, T.; Nakagata, N. et al. (2014): Influence of Npc1 genotype on the toxicity of hydroxypropyl- β -cyclodextrin, a potentially therapeutic agent, in Niemann-Pick Type C disease models. In: *Molecular Genetics and Metabolism Reports* 1, S. 19–30.
- Taylor, A. M.; Liu, B.; Mari, Y.; Liu, B.; Repa, J. J. (2012): Cyclodextrin mediates rapid changes in lipid balance in Npc1^{-/-} mice without carrying Cholesterol through the bloodstream. In: *Journal of lipid research* 53 (11), S. 2331–2342.
- Treiber, A.; Morand, O.; Clozel, M. (2007): The pharmacokinetics and tissue distribution of the glucosylceramide synthase inhibitor miglustat in the rat. In: *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems* 37 (3), S. 298–314.
- Treit, D.; Fundytus, M. (1988): Thigmotaxis as a test for anxiolytic activity in rats. In: *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 31 (4), S. 959–962.
- van Gaalen, M. M.; Steckler, T. (2000): Behavioural analysis of four mouse strains in an anxiety test battery. In: *Behavioural Brain Research* 115 (1), S. 95–106.
- Vance, J. E. (2006): Lipid imbalance in the neurological disorder, Niemann-Pick C disease. In: *FEBS letters* 580 (23), S. 5518–5524.
- Vance, J. E.; Peake, K. B. (2011): Function of the Niemann-Pick type C proteins and their bypass by cyclodextrin. In: *Current opinion in lipidology* 22 (3), S. 204–209.
- Vanier, M. T. (2010): Niemann-Pick disease type C. In: *Orphanet journal of rare diseases* 5, S. 16.
- Vázquez, M. C.; Balboa, E.; Alvarez, A. R.; Zanlungo, S. (2012): Oxidative stress: a pathogenic mechanism for Niemann-Pick type C disease. In: *Oxidative medicine and cellular longevity* 2012, S. 205713.
- Villiers A. (1891): Sur la transformation de la fécule en dextrine par le ferment butyrique. In: *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, S. 435–438.
- Vite, C. H.; Bagel, J. H.; Swain, G. P.; Prociuk, M.; Sikora, T. U.; Stein, V. M. et al. (2015): Intracisternal cyclodextrin prevents cerebellar dysfunction and Purkinje cell death in feline Niemann-Pick type C1 disease. In: *Science translational medicine* 7 (276), S. 276ra26.
- Walf, A. A.; Frye, C. A. (2007): The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. In: *Nature protocols* 2 (2), S. 322–328.
- Walsh, R. N.; Cummins, R. A. (1976): The Open-Field Test: a critical review. In: *Psychological bulletin* 83 (3), S. 482–504.
- Walterfang, M.; Patenaude, B.; Abel, L. A.; Klunenmann, H.; Bowman, E. A.; Fahey, M. C. et al. (2013): Subcortical volumetric reductions in adult Niemann-Pick disease type C: a cross-sectional study. In: *AJNR. American journal of neuroradiology* 34 (7), S. 1334–1340.

6. Literaturverzeichnis

- Wraith, J. E.; Vecchio, D.; Jacklin, E.; Abel, L.; Chadha-Boreham, H.; Luzy, C. et al. (2010): Miglustat in adult and juvenile patients with Niemann-Pick disease type C: long-term data from a clinical trial. In: *Molecular genetics and metabolism* 99 (4), S. 351–357.
- Wiesenfeld-Hallin, Z.; Xu, X. J.; Hughes, J.; Horwell, D. C.; Hökfelt, T. (1990): PD134308, a selective antagonist of cholecystokinin type B receptor, enhances the analgesic effect of morphine and synergistically interacts with intrathecal galanin to depress spinal nociceptive reflexes. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (18), S. 7105–7109.
- Williams, I. M.; Wallom, K.-L.; Smith, D. A.; Al Eisa, N.; Smith, C.; Platt, F. M. (2014): Improved neuroprotection using miglustat, curcumin and ibuprofen as a triple combination therapy in Niemann-Pick disease type C1 mice. In: *Neurobiology of disease* 67, S. 9–17.
- Winsor, E. J.; Welch, J. P. (1978): Genetic and demographic aspects of Nova Scotia Niemann-Pick disease (type D). In: *American journal of human genetics* 30 (5), S. 530–538.
- Yan, X.; Lukas, J.; Witt, M.; Wree, A.; Hubner, R.; Frech, M. et al. (2011): Decreased expression of myelin gene regulatory factor in Niemann-Pick type C 1 mouse. In: *Metabolic brain disease* 26 (4), S. 299–306.
- Yan, X.; Yang, F.; Lukas, J.; Witt, M.; Wree, A.; Rolfs, A.; Luo, J. (2014): Hyperactive glial cells contribute to axonal pathologies in the spinal cord of Npc1 mutant mice. In: *Glia* 62 (7), S. 1024–1040.
- Yan, X.; Ma, L.; Hovakimyan, M.; Lukas, J.; Wree, A.; Frank, M. et al. (2014): Defects in the retina of Niemann-pick type C 1 mutant mice. In: *BMC neuroscience* 15, S. 126.
- Yan, X.; Lukas, J.; Lin, J.; Ernst, M.; Koczan, D.; Witt, M. et al. (2014): Aberrant expressions of delta-protocadherins in the brain of Npc1 mutant mice. In: *Histology and histopathology* 29 (9), S. 1185–1199.
- Yanagimoto, C.; Harada, M.; Kumemura, H.; Koga, H.; Kawaguchi, T.; Terada, K. et al. (2009): Niemann-Pick C1 protein transports copper to the secretory compartment from late endosomes where ATP7B resides. In: *Experimental cell research* 315 (2), S. 119–126.
- Yanagimoto, C.; Harada, M.; Kumemura, H.; Abe, M.; Koga, H.; Sakata, M. et al. (2011): Copper incorporation into ceruloplasmin is regulated by Niemann-Pick C1 protein. In: *Hepatology research: the official journal of the Japan Society of Hepatology* 41 (5), S. 484–491.
- Yu, W.; Gong, J.-S.; Ko, M.; Garver, W. S.; Yanagisawa, K.; Michikawa, M. (2005): Altered Cholesterol metabolism in Niemann-Pick type C1 mouse brains affects mitochondrial function. In: *The Journal of biological chemistry* 280 (12), S. 11731–11739.
- Yu, D.; Swaroop, M.; Wang, M.; Baxa, U.; Yang, R.; Yan, Y. et al. (2014): Niemann-Pick Disease Type C: Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neuronal Cells for Modeling Neural Disease and Evaluating Drug Efficacy. In: *Journal of biomolecular screening* 19 (8), S. 1164–1173.
- Zampieri, S.; Mellon, S. H.; Butters, T. D.; Nevyjel, M.; Covey, D. F.; Bembi, B.; Dardis, A. (2009): Oxidative stress in NPC1 deficient cells: protective effect of allopregnanolone. In: *Journal of cellular and molecular medicine* 13 (9B), S. 3786–3796.
- Zervas, M.; Somers, K. L.; Thrall, M. A.; Walkley, S. U. (2001): Critical role for glycosphingolipids in Niemann-Pick disease type C. In: *Current biology : CB* 11 (16), S. 1283–1287.
- Zhang, M.; Wang, X.; Jiang, F.; Wang, W.; Vincent, I.; Bu, B. (2010): Mitotic epitopes are incorporated into age-dependent neurofibrillary tangles in Niemann-Pick disease type C. In: *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* 20 (2), S. 367–377.

6. Literaturverzeichnis

Internetadressen

Bioprobshk: http://www.bioprobeshk.com/catalog/products.php?cPath=21_69 zuletzt aufgerufen am 14.10.2016

Clinical Trials: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT01747135> zuletzt aufgerufen am 14.10.2016

European Commisison: http://ec.europa.eu/health/rare_diseases/policy/index_en.htm zuletzt aufgerufen am 14.10.2016

European Medicines Agency:

http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000435/human_med_001171.jsp&mid=WC0b01ac058001d124 zuletzt aufgerufen am 14.10.2016

Human Protein Database:

http://www.hprd.org/summary?hprd_id=03008&isoform_id=03008_1&isoform_name= zuletzt aufgerufen am 14.10.2016

Physiological Research, URL: <http://physiologicalresearch.weebly.com/water-maze-test.html>, zuletzt aufgerufen am 14.10.16

Pub Chem: http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=51634&loc=ec_rcs aufgerufen am 14.10.16

Pub Chem:

http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=44134771&loc=ec_rcs aufgerufen am 14.10.16

Pub Chem: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>; CID 31402, zuletzt aufgerufen am 14.10.2016

7. Erklärung

7. Erklärung

Die vorliegende Dissertation wurde weder vorher noch gleichzeitig bei einer anderen Fakultät eingereicht.

Ich versichere an Eides statt, dass die eingereichte Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe, abgesehen von den Hilfestellungen, auf die in der Danksagung hingewiesen wird, verfasst und ich andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt habe. Die wörtlich oder inhaltlich verwendeten Quellen wurden als solche kenntlich gemacht.

Ich erkläre, dass ich noch kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Lübeck, den

.....

Markus Thieme

8. Danksagungen

Mein Dank gilt zu aller erst Prof. Andreas Wree für die Möglichkeit meine Dissertation im Institut für Anatomie im Bereich der Neuroanatomie schreiben zu dürfen. Stets stand er mir mit seinem Fachwissen zur Seite und war bei Fragen schnell und unkompliziert zu erreichen. Desweiteren möchte ich Prof. Arndt Rolfs vom Albrecht-Kossel-Institut für seine besondere Expertise und Hilfe beim Zustandekommen Gesamtprojekts danken.

Mein besonderer Dank gilt Victoria Schlegel für die Zusammenarbeit bei den Experimenten und Hilfe bei der Bearbeitung des umfangreichen Themas über die letzten Jahre. Desweiteren möchte ich Dr. med. Jana Petersen und Dr. med. Fabian Maass für den Beistand bei den Experimenten, die Einführung in die Verhaltenstestung und die generelle Hilfe bei dieser Arbeit danken, außerdem danke ich ihnen für die Bereitstellung einiger Fotos.

Weiterer Dank gilt Dr. phil. Ulrike Grittner für die Hilfe bei der statistischen Bearbeitung der Daten. Stets stand mir mit Rat und Tat zur Seite. Besonderer Dank gilt in diesem Zusammenhang auch Dr. rer. nat. Carsten Holzmann für die schnelle Hilfe bei Fragen zu den Verhaltenstests und deren Auswertung, sowie seiner technischen Expertise.

Ohne die Mitarbeiter des Instituts für Anatomie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Darum möchte ich hier Herrn Mathias Lietz für die Hilfe bei der Behandlung und im Umgang mit den Tieren, Susann Lehmann ebenfalls für den Umgang mit den Tieren danken.

Abschließend möchte ich noch meinen Freunden und meiner Familie für den Beistand und Zuspruch über die Jahre danken.

„Die Naturwissenschaft braucht der Mensch zum Erkennen,
den Glauben zum Handeln.“

Max Planck